

Université de Sherbrooke

**Augmentation du potentiel métastatique de cellules cancéreuses
du sein après irradiation γ ou un stress oxydatif induit par le 4-
hydroxyestradiol**

Par
Catherine Baptiste
Département de Médecine Nucléaire et Radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Radiobiologie

juin 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-25931-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-25931-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Citation:

If the facts don't fit the theory, change the facts.

Albert Einstein (1879 - 1955)

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
RÉSUMÉ	IX
INTRODUCTION	I
1- Cancer du sein	1
1-1 Épidémiologie	1
1-1-1 Facteurs de risque connus	1
1-1-2 Facteurs de risque possibles	2
1-2 Les différents types de cancer du sein	2
1-3 Invasion et formation de métastases	3
1-3-1 Rôle des molécules d'adhésion	4
1-3-2 Rôle des MMPs	5
1-3-3 Rôle des TIMPs	9
1-3-4 Activation de la proMMP-2 par le complexe ternaire MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2	10
2- Traitements du cancer du sein	11
2-1 Choix du type de traitement	11
2-2 La radiothérapie	12
2-3- Récurrence du cancer du sein après traitement	14
3- Les estrogènes	16
3-1 L'estradiol	17
3-2 Effets bénéfiques	17
3-3 Effets néfastes – estrogène et cancer du sein	18
3-3-1 Stress oxydatif et espèces réactives à l'oxygène	19
3-3-2 Métabolites de l'estradiol et réaction de Fenton	19
3-4 Stress oxydatif et invasion	21
3-5 But et objectifs spécifiques	22
MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
RÉSULTATS	35
1- Les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7	35
2- Effet de l'irradiation	35
2-1 L'irradiation gamma augmente la capacité d'invasion des cellules MDA-MB-231	35
2-1-1 La concentration cellulaire influence l'invasion	37
2-1-2 Les radiations ionisantes induisent le relâchement de facteurs emmagasinés dans la MB qui augmente l'invasion de cellules cancéreuses du sein	38
2-2 Rôle clé de la MMP-2 dans l'invasion	40
2-2-1 L'expression de la MMP-2 issue des cellules cancéreuses du sein stimulée par l'irradiation de la MB.	41
2-2-2 Augmentation de la sécrétion de proMMP-2	42
2-2-3 Augmentation de l'activité de la MMP-2 lorsque la MB est irradiée	43

2-2-4 Régulation de la stimulation de la MMP-2 au niveau de l'expression génique	44
2-3 Coexpression de la MMP-2, MT1-MMP et de la TIMP-2.	45
2-3-1 Induction de l'expression génique de la MMP-2, MT1-MMP et TIMP-2 par les radiations	47
2-3-2 Profil d'expression génique des MMPs et TIMPs	48
2-3-3 La MT1-MMP, une enzyme clé de l'invasion	49
3- Effet de la 4-OHE ₂	53
3-1 La 4-OHE ₂ a le potentiel d'augmenter l'invasion des cellules MDA-MB-231	53
3-2 La 4-OHE ₂ augmente la sécrétion de la proMMP-2 et l'active chez les cellules MDA-MB-231	54
3-3 La 4-OHE ₂ augmente l'expression de certains gènes	56
4- Effet combiné de la radiation gamma et de la 4-OHE ₂	57
4-1 Profils d'expression des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7	57
DISCUSSION	59
CONCLUSION	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie du sein, vue latérale d'une coupe sagittale.	3
Figure 2. Invasion de la matrice extracellulaire.	5
Figure 3. Structure schématisée des MMPs.	6
Figure 4. Formation du complexe ternaire MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2.	10
Figure 5. Formation des métabolites de l'estradiol : 2- et 4-hydroxyestradiol.	19
Figure 6. Formation de radicaux libres par les hydroxyestrogènes.	20
Figure 7. Effet de l'irradiation du Matrigel™ sur la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein.	36
Figure 8. Effet de la concentration des cellulesensemencée sur du Matrigel™ sur l'invasion.	38
Figure 9. Relâchement de la MMP-2 emmagasinée dans le Matrigel™.	41
Figure 10. Augmentation de la sécrétion de proMMP-2 des cellules cancéreuses induite par les radiations ionisantes.	42
Figure 11. Effet de l'irradiation sur le niveau d'activation de la MMP-2 sur les cellules MDA-MB-231.	43
Figure 12. Niveau d'expression de la MMP-2 en fonction du support sur lequel sontensemencées les cellules MDA-MB-231.	45
Figure 13. Analyse RT-PCR de la MMP-2, MT1-MMP et TIMP-2 chez les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7 de cancer du sein cultivées en monocouche sur du Matrigel™.	46
Figure 14. Effet de l'irradiation du Matrigel™ sur le niveau d'expression de la MMP-2, de la MT1-MMP et de la TIMP-2.	47
Figure 15. siRNA de MT1-MMP et MAPK1.	51
Figure 16. Effet de la 4-OHE ₂ sur l'invasion de cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	53
Figure 17. Effet de la 4-OHE ₂ sur la sécrétion de la proMMP-2 chez les lignées cellulaires cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7.	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des MMPs.	7
Tableau 2. Classification des TIMPs.	9
Tableau 3. Séquences des siRNA et des amorces utilisés pour la transfection.	29
Tableau 4. Amorces de PCR et longueurs de produits d'amplification.	32
Tableau 5. Conditions des PCR pour les amorces utilisées.	33
Tableau 6. Effet de l'irradiation du Matrigel™ sur l'invasion des cellules MDA-MB-231.	39
Tableau 7. Effet de l'irradiation du Matrigel™, profil d'expressions géniques des MMP-1, -3, -13 et TIMP-1, -3, -4 pour les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	48
Tableau 8. Effet de l'irradiation du Matrigel™, profil d'expressions géniques des MMP-9, -13 et TIMP-1, -2, -3, -4 pour les cellules cancéreuses du sein MCF-7.	49
Tableau 9. Effet de l'irradiation sur l'invasion des cellules MDA-MB-231 lorsque l'expression de la MT1-MMP est inhibée.	52
Tableau 10. Effet de la 4-OHE ₂ , profils d'expressions géniques des MMP-1, -2, -3, -9, -13, MT1-MMP et TIMP-1, -2, -3, -4 pour les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et MCF-7.	56
Tableau 11. L'effet combiné des 2 traitements des cellules de MDA-MB-231 et celle de MCF-7 pour les gènes de MMP-1, -2, -3, -9, -13, MT1-MMP, TIMP-1, -2, -3 et -4.	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-OHE₁ : 2-hydroxyestrone

2-OHE₂ : 2-hydroxyestradiol

4-OHE₁ : 4-hydroxyestrone

4-OHE₂ : 4-hydroxyestradiol

APMA : acetate de p-aminophenylmercurique

bFGF : Beta fibroblast growth factor

BSA : Bovine Sérum Albumine

IGF-1 : Insulin-like growth factor 1

DEPC : diethyl pyrocarbonate

E₂ : Estradiol

ERK : Signal extracellulaire régulée par les kinases

ERO : Espèce réactive à l'oxygène

FBS : Sérum foetal bovin

FSH : Hormone folliculostimulante

GAPDH : Glyceraldehyde phosphate déshydrogénase

GFP-22 : Green factor protein 22

hEGF : Human epidermal growth factor

H₂O₂ : Péroxyde

HO[•] : Radical hydroxyle

LH : Hormone lutéinisante

MAP kinase : Mitogen-activated protein kinase

MB : Membrane basale

MEBM : Mammary Epithelium Basal Medium

MEC : Matrice extracellulaire

MEM : Minimum Essential Medium

M-MLV : Moloney Murine Leukemia Virus

MMP : Métalloprotéinase de Matrice

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NGF : Nerve growth factor

O₂^{•-} : Anion superoxyde

PBE : Bovine pituitary extract

PBS : Tampon NaCl et phosphate

pd(N)₆ : Hexamère d'oligonucléotides à séquences aléatoires

PDGF : Platelet-derived growth factor

PMA : Phorbol-12-myristate-13-acetate

Real-Time PCR : Réaction en chaine de la polymérase en temps réel

RT-PCR : Transcription inverse et réaction en chaine de la polymérase

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulphate

TEM : Transition épithélio-mésenchymale

TGF-β : Transforming growth factor

RÉSUMÉ

Bien que les taux de survie soient des plus élevés depuis 1950 au Canada, le cancer du sein peut réapparaître jusqu'à 15 ans après traitements par radiations. Les radiations produisent des radicaux libres reconnus pour activer les métalloprotéinases de matrice (MMP). Ces MMPs sont relâchées par les cellules cancéreuses sous forme inactive (proMMP) et peuvent être activées par des radicaux libres. Les MMPs activées, dont la MMP-2 et -9, dégradent la matrice extracellulaire (MEC) qui a pour rôle d'empêcher le passage des cellules cancéreuses de la tumeur primaire vers la circulation sanguine et lymphatique. Une fois cet obstacle contrecarré, les cellules cancéreuses forment alors des métastases. Le métabolisme de l'estradiol est altéré chez presque sinon toutes les cellules cancéreuses du sein. Ce qui résulte en une accumulation de ces métabolites. Ces derniers génèrent des radicaux libres qui comme cela a été prouvé par plusieurs équipes causent des mutations cellulaires. Mais, une autre conséquence de la présence de ces métabolites a attiré notre attention. La stimulation de l'expression de MMPs clés de l'invasion et l'augmentation de leur activation. Ce projet de recherche s'articule suivant trois axes. L'objectif premier consistait à déterminer si les radiations pourraient effectivement augmenter la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein. Le second, était d'examiner

l'implication des métabolites de l'estradiol, en l'occurrence la 4-OHE₂, dans ce phénomène d'invasion. En dernier lieu, il s'avérerait important de vérifier l'existence d'un effet synergique des précédents phénomènes observés. En utilisant des chambres d'invasion, l'irradiation (5 à 20 Gy) de la matrice basale (MB) artificielle augmentait de 2,5 fois la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Lorsque ces mêmes cellules ont été traitées avec la 4-OHE₂, une augmentation de l'invasion de plus de 3 fois a également été observée. À la suite de ces expériences, les niveaux d'ARNm des MMPs clés de l'invasion ont augmenté. Inversement chez les MCF-7, des cellules faiblement métastatiques, aucune augmentation n'a été observée. Bien que très utiles pour les traitements, les radiations pourraient contribuer à la migration des cellules cancéreuses, favorisant ainsi la formation des métastases et la récurrence du cancer du sein. La 4-OHE₂ produite par les cellules cancéreuses influence aussi la capacité d'invasion de ces cellules. Pour contrer ces effets, il serait donc intéressant d'utiliser lors des traitements des inhibiteurs de MMPs. C'est une voie potentielle d'avenir pour empêcher toute récurrence du cancer du sein.

Mots clés : cancer, MMP, métastase, stress oxydatif.

INTRODUCTION

1- Cancer du sein

1-1 Épidémiologie

L'Institut National du cancer du Canada rapporte que le cancer du sein est le cancer féminin le plus souvent diagnostiqué au Canada et le deuxième en importance concernant la mortalité. En 2005 seulement, suivant une estimation statistique, 21800 Canadiennes seraient diagnostiquées pour un cancer du sein et 5300 seraient décédées des suites de cette maladie. Ces statistiques correspondent à une incidence d'une femme sur neuf qui risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie et celle d'une femme sur 27 qui risque d'en mourir.

1-1-1 Facteurs de risque connus

Dans cette catégorie, entre en jeu le risque lié au sexe. En effet, 99% des cancers du sein surviennent chez les femmes et ce risque augmente avec l'âge.

Les femmes qui ont eu un début de règle précoce (avant 12 ans) et une ménopause tardive (après 55 ans) accompagnés d'une première maternité après 30 ans ou aucune maternité sont plus à risque. Un traitement substitutif hormonal prolongé accentue aussi l'exposition aux estrogènes et contribue à augmenter l'incidence du cancer du sein (OKOBIA et BUNKER, 2005).

Il est estimé que 5 à 10% des cancers du sein ont une origine familiale. Ces cancers sont reliés à des mutations aux gènes BRCA-1 et BRCA-2 (DAHIYA et DENG, 1998). D'autres gènes ont aussi un potentiel oncogénique. Environ 30% des cancers du sein s'accompagnant des pires pronostics sont associés avec une surexpression de Her2/neu (SLAMON et al., 1987).

Le manque d'activité physique, l'embonpoint et l'obésité font aussi partie de ces facteurs de risque connus.

1-1-2 Facteurs de risque possibles

L'alimentation pauvre en fruits et légumes, la consommation excessive d'alcool, le tabagisme ou l'exposition à la fumée secondaire, la prise de contraceptifs oraux et l'absence d'allaitement au sein peuvent aussi augmenter le risque de développer le cancer du sein (SANTÉ CANADA, 2004).

1-2 Les différents types de cancer du sein

Les tumeurs ont différentes appellations suivant le type de cellules d'origine. Le cancer du sein est répertorié en 3 grandes familles.

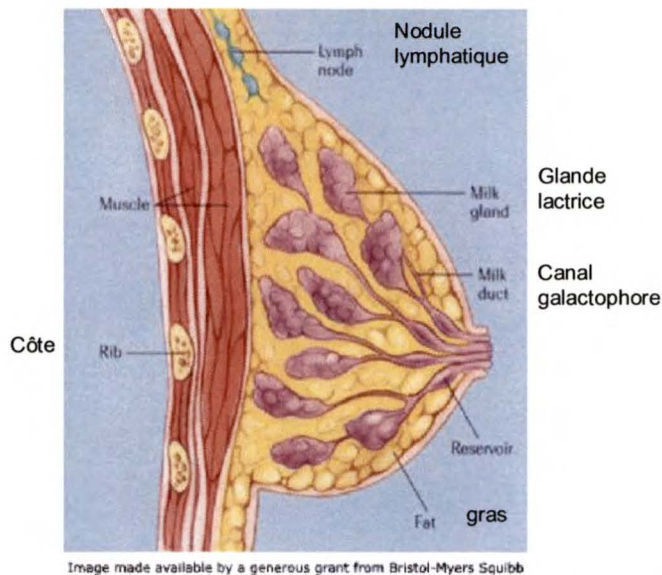


Image made available by a generous grant from Bristol-Myers Squibb

Fig. 1 : anatomie du sein, vue latérale d'une coupe sagittale.

Ainsi, un carcinome désigne une tumeur issue de cellules épithéliales. Pour le sein, le carcinome est issu de cellules épithéliales qui tapissent les canaux galactophores (Fig.1). L'adénocarcinome lui prend naissance dans des cellules épithéliales qui constituent les acini des glandes mammaires productrices de lait. Ce type de cancer est le plus fréquent. Le sarcome appartient à la famille de cancer se développant à partir des fibroblastes du tissu de soutien.

1-3 Invasion et formation de métastases

Les métastases constituent la principale cause d'échec des traitements anti-cancéreux. Ces masses cancéreuses se forment des suites d'une migration de cellules malignes issues de la tumeur primaire qui ont traversées la membrane basale (MB) et la matrice interstitielle. Détachées de leur site initial, elles entrent dans le système sanguin ou lymphatique à proximité. La formation des

métastases à distance se fait plus particulièrement au niveau des os, des poumons et du foie (PORTER et al., 2004).

1-3-1 Rôle des molécules d'adhésion

Aussi, dans de nombreux types de cancer, un lien a été établi entre la perte de l'expression de E-cadhérine, les phénomènes d'invasion et de formation de métastases. Des expériences réalisées avec des cellules cancéreuses induisant l'augmentation de la production de E-cadherine ont permis la suppression de l'invasion (CHIN et al., 2005). Cela suggérerait donc qu'augmenter la capacité des cellules tumorales à s'attacher l'une à l'autre résulterait en une suppression de la capacité d'invasion de ces dernières.

Un épithélium normal reposant sur une membrane basale peut donc proliférer localement pour donner naissance à une tumeur. L'acquisition du caractère malin à la suite d'une accumulation de changements épigénétiques, de mutations génétiques, la perte de jonctions intercellulaires et la résistance à l'apoptose qui s'en suit (Anoïkis) marquent le début du processus d'invasion (Fig.2) par le biais de la transition épithélio-mésenchymal (TEM). Des cellules épithéliales à ce stade perdent une bonne partie de leurs caractéristiques épithéliales pour acquérir celles des cellules mésenchymales et ainsi optimiser leur capacité migratoire. Ce concept est de plus en plus étudié même si toutes les cellules cancéreuses de la tumeur d'origine épithéliales ne procèdent pas au même moment à cette TEM (THIERY, 2002). Ces cellules en devenant métastatiques sécrètent des protéinases, principalement des MMPs, qui

dégradent la MB et commence à migrer dans le milieu interstitiel pour s'installer dans un tissu accueillant où elle pourra proliférer et former une métastase (KUMAR et al., 1997).

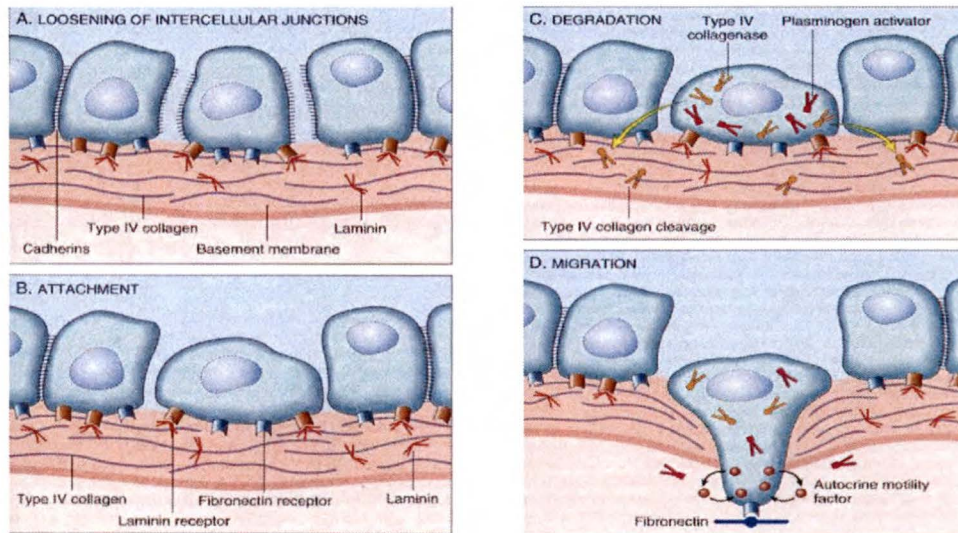


Figure 2. Invasion de la matrice extracellulaire (KUMAR et al., 1997)

1-3-2 Rôle des MMPs

Les MMPs sont des enzymes caractérisées par la présence d'un atome de zinc dans leur site actif. Les MMPs ont une structure particulière. Deux catégories de MMPs ont été répertoriées, celles qui sont sécrétées et celles qui sont ancrées dans la membrane cellulaire (Fig.3). Ces dernières portent le nom de MMP transmembranaire (MT-MMPs).

Les MMPs sont synthétisées sous une forme inactive, zymogène (proMMPs), par différents types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les leucocytes, les macrophages et les cellules cancéreuses. La conformation physiologique du zymogène présente un domaine propeptide

recouvrant son site actif, bloquant ainsi l'accès à son substrat. Pour l'activer, le domaine propeptide doit être clivé.

Les MMPs dégradent les protéines de la MB et de la matrice interstitielle. Elles jouent un rôle important dans les fonctions naturelles tel que le développement et le remodelage des tissus, mais peuvent conduire à diverses maladies lorsqu'elles sont exprimées de façon non contrôlée, telles que l'arthrite rhumatoïde, la croissance des tumeurs et la formation des métastases.

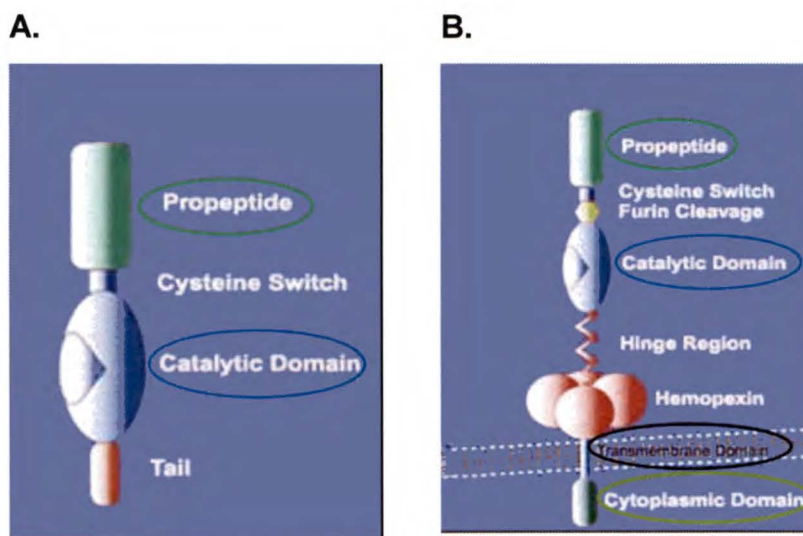


Figure 3. Structure schématisée des MMPs. A. MMP libre. B. MMP transmembranaire (MT-MMP).

Plusieurs MMPs ont été découvertes et ont été classifiées, faisant toutes partie de la même famille. Dans le tableau 1 présenté ci-dessous, les MMPs sont classées en fonction de leurs substrats.

MMP Family	Enzyme		Principal Substrates
	Descriptive Name	No.	
Collagenases	Interstitial collagenase	MMP-1	Fibrillar collagens, types I, II, III
	Neutrophil collagenase	MMP-8	
	Collagenase-3	MMP-13	
	Xenopus collagenase	MMP-18	
Gelatinases	Gelatinase A	MMP-2	Nonfibrillar collagens, types IV, V
	Gelatinase B	MMP-9	
Stromelysins	Stromelysin-1	MMP-3	Proteoglycans, laminin, fibronectin, nonfibrillar collagens
	Stromelysin-2	MMP-10	
	Matrilysin	MMP-7	
	Stromelysin-3	MMP-11	
Elastase	Matrilysin	MMP-7	Serine protease inhibitors
	Matrilysin	MMP-7	Elastin, nonfibrillar collagen
Membrane type	MT1-MMP	MMP-14	Progelatinase A, undefined
	MT2-MMP	MMP-15	
	MT3-MMP	MMP-16	
	MT4-MMP	MMP-17	
	MT5-MMP	MMP-21	
	MT5-MMP	MMP-21	
Unclassified	Enamelysin	MMP-20	Undefined
		MMP-19	
		MMP-23	
		MMP-24	

Tableau 1. Classification des MMPs (NELSON et al., 2000)

1-3-2-1 Les MMPs et le cancer du sein

L'invasion des cellules cancéreuses nécessite la dégradation des protéines de la MB qui agit comme une barrière au passage des cellules de la tumeur. Plusieurs MMPs sont impliquées dans la progression du cancer du sein et donc reliées à un mauvais pronostic. Les MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10, -11, -12 et -13 ainsi que MT1-MMP sont fréquemment détectés dans les tumeurs du sein lors de biopsies et dans les lignées cellulaires de cancer du sein (BALDUYCK et al., 2000; BODEY et al., 2001; FROMIGUE et al., 2003; GARBETT et al., 1999; IWATA et al., 1996; MIMORI et al., 2001; POLETTE et al., 1993).

L'implication de la MMP-2 dans ce processus semble être importante puisqu'elle est fortement exprimée lors des premier stades de la formation des tumeurs primaires du cancer du sein (POULSOM et al., 1993). Cette dernière n'est pas exprimée dans les tissus mammaires normaux mais l'est lorsque certaines tumeurs bénignes tels que les fibroadénomes se développent (POLETTE et al., 1993). Avec les tests d'immunoréactivité la MMP-2 s'est révélée être un indicateur indépendant de la diminution de survie des patientes atteintes par le cancer du sein (IWATA et al., 1996; POLETTE et al., 1993; TALVENSAARI-MATTILA et al., 1998).

Des études sur les carcinomes ductaux infiltrants, tubulaires et lobulaires infiltrants montrent que l'expression de la MT1-MMP était associée de façon significative à la présence de nodules lymphatiques métastatiques, de métastases à distance, au stade clinique des tumeurs et à leurs tailles (JONES et al., 1999; SHIOMI & OKADA, 2003; UENO et al., 1997). L'expression protéique de la MT1-MMP était positive dans 52,2% des tissus du cancer du sein. De plus, pour les cancers du sein humains aux stades I, II et III, les taux d'expression étaient respectivement 12,5%, 54,8% et 85,7% ($p < 0,05$) et dans les groupes T(1), T(2) et T(3), ils s'élevaient à 11,1%, 59,4% et 80,0% ($p < 0,05$). Dans les groupes N(0), N(1) et N(2), ils étaient respectivement de 27,3%, 66,7% et 100% ($p < 0,05$) (YAO et al., 2004). Après des tests immunohistochimiques, la MT1-MMP était localisée principalement à la surface des cellules de carcinomes sur tous les échantillons testés (UENO et al., 1997).

1-3-3 Rôle des TIMPs

L'activité des MMPs peut être régulée par des inhibiteurs spécifiques appelés inhibiteurs aux métalloprotéinases (TIMPs) (Brew et al., 2000 ; Hayakawa, 2002). Ces inhibiteurs ont été dénombrés au nombre de 4, soit TIMP-1 à -4. Ils sont exprimés par les mêmes cellules qui synthétisent les MMPs. La spécificité de ces TIMPS pour les différentes MMPS est résumée au tableau 2.

Tableau 2. Classification des TIMPs. (Brew et al., 2000 ; Hayakawa, 2002)

<u>Nom</u>	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
<u>Inhibition des MMPs</u>	Toutes sauf MT1-MMP	Toutes	MMPs-1, -2, -3, -9 et -13	MMPs-1, -2, -3, -7 et -9
<u>Activité inhibitrice la plus effective</u>	MMP-1	MMP-2 et MMP-9	?	MMP-2 et MMP-7
<u>Localisation</u>	Diffuse	diffuse	Liée à MEC	Diffuse

1-3-4 Activation de la proMMP-2 par le complexe ternaire MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2

L'expression des MMPs n'est pas exclusivement associée à l'agressivité des tumeurs. C'est le cas du complexe ternaire MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2 qui joue un rôle important dans le remodelage physiologique de la MB des acini et des canaux de seins normaux. De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre le fonctionnement et le rôle du complexe ternaire MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2 (BREW et al., 2000 ; SATO et al. 2005) (Fig. 4).

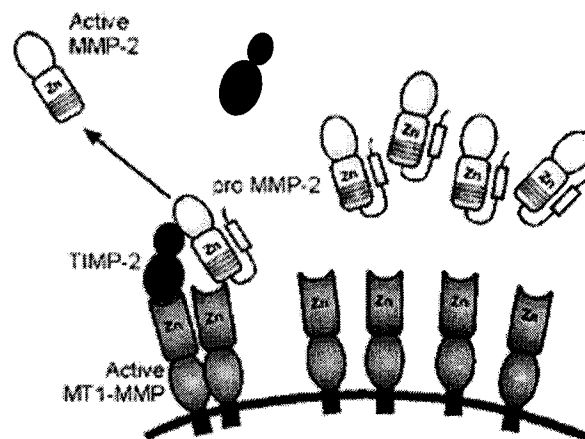


Figure 4. Formation du complexe ternaire MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2.
(BREW et al., 2000 ; SATO et al. 2005)

L'activation de la proMMP-2 se fait à la surface de la cellule par la formation d'un complexe protéique ternaire. Cette activation nécessite la présence à la fois de deux molécules de MT1-MMP et d'une molécule de TIMP-2. La MT1-MMP seule peut activer la proMMP-2 mais l'effet est moins efficace. Les TIMP-2 et proMMP-2 sont sécrétées par la cellule. Des molécules de MT1-MMP

ancrées à la surface de cette dernière se retrouvent au front de migration. Une fois les MT1-MMP activées, les TIMP-2 peuvent s'associer à ces dernières dans un ratio 1 : 1. Cela permet donc à la proMMP-2 de venir se lier à la TIMP-2. Une autre MT1-MMP active et libre viens alors s'associer au complexe pour cliver le propeptide de la MMP-2. La MMP-2 active est libérée et est prête à exercer sa fonction (BREW et al., 2000 ; SATO et al. 2005).

2- Traitements du cancer du sein

2-1 Choix du type de traitement

Le traitement choisi dépend principalement du stade de la maladie. La probabilité de guérison est d'autant plus grande que la lésion est petite. Un taux de guérison de 60% peut être obtenu pour les tumeurs de moins de 3cm de diamètre et monte à 90% pour les tumeurs de moins de 1cm (HAYES, 2005). Les causes d'échecs sont généralement la conséquence d'un envahissement métastatique qui ne peut plus être maîtrisé (BRENNAN et al. 2005). Même si aujourd'hui les traitements disponibles sont plus efficaces que par le passé, ceux-ci demeurent agressifs et s'accompagnent de nombreux effets secondaires.

Les traitements pour un cancer du sein peuvent se classer en trois grands groupes. Le premier consiste à traiter le sein en employant la chirurgie conservatrice et la radiothérapie ou procéder à l'ablation complète du sein (mastectomie) accompagnée ou non de radiothérapie et pouvant être complétée par une reconstruction du sein. Le deuxième a pour but de traiter le sein et sa région axillaire (au niveau de l'aisselle). Une biopsie de nodules sentinelles est effectuée afin de détecter la présence de cellules métastatiques. Si le résultat s'avère positif, un curage axillaire de nodules lymphatiques est effectué. Certains de ces traitements nécessitent une radiothérapie. Entre ensuite en jeu, la troisième composante qui s'adresse à la dispersion systémique du cancer. Trois thérapies sont alors utilisées. La chimiothérapie peut être administrée en adjuvant pré ou post opératoire. L'hormonothérapie est administrée chez les patientes ayant des tumeurs qui expriment des récepteurs à estrogènes ou progestérone. Et tout récemment, l'administration d'anticorps monoclonaux pour les tumeurs qui expriment des antigènes caractéristiques à la surface de leurs cellules, comme Her2/neu (BRENNAN et al. 2005).

2-2 La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement de choix contre le cancer du sein puisqu'elle agit directement sur la tumeur et que ses effets secondaires sont minimes. Le but est de détruire et d'éliminer la tumeur. La cible la plus importante pour la radiothérapie est l'ADN des cellules cancéreuses (HALL, 2000).

La radiothérapie consiste à utiliser la propriété fondamentale de la radiation ionisante qui est de former des ions en brisant des liens chimiques. Cette énergie est émise sous forme d'ondes (rayons gamma et rayon X) ou de particules (particules alpha, particules bêta) et d'autre formes de noyaux chargés.

On parle d'effet direct lorsque les radiations ionisantes interagissent directement avec la molécule d'ADN et l'endommagement. L'effet peut être indirecte quand le photon ou la particule interagit tout d'abord avec d'autres molécules, en particulier l'eau, constituant principal de la cellule, pour produire des radicaux libres qui vont occasionner à leur tour des dommages à l'ADN (HALL, 2000). L'accumulation des dommages induit la mort cellulaire.

Pour un cancer du sein, il est possible d'administrer une dose totale de plus de 50Gy, mais il est préférable de fractionner la dose afin de préserver les tissus sains. Une dose de 2Gy est la dose suffisante pour occasionner des dommages aux cellules qui peuvent être réparables. Mais, administrée à une fréquence de 2Gy par jour 5 fois par semaine, elle permet aux cellules saines ayant un système de réparation de dommages plus efficace que les cellules tumorales de repeupler l'espace (AWWAD, 1992). De plus, ce fractionnement permet une réoxygénation de la tumeur dont le centre est constitué de cellule en hypoxie. Plus on se rapproche du cœur de la tumeur, plus l'apport d'oxygène est faible. Souvent dans des tumeurs en stade avancé, il est observé un cœur nécrosé. La présence d'oxygène lors de l'irradiation a un effet radiosensibilisant en augmentant la formation de radicaux hydroxyle par la radiolyse de l'eau

contenue dans les cellules. Ce radical joue un rôle important puisque c'est le responsable de près des deux tiers des dommages qui sont causés à l'ADN (HALL, 2000). Le fractionnement induit aussi une synchronisation des cellules en phase G_2/M du cycle cellulaire, phase critique où les cellules sont particulièrement radiosensibles (AWWAD, 1992).

Afin d'atteindre la tumeur sans porter atteinte aux tissus environnants, plusieurs sources de radiations sont dirigées vers la cible suivant différents angles d'entrée. Le maximum de radiation est alors localisé à la tumeur ce qui diminue la dose de radiation aux tissus sains avoisinants.

2-3- Récurrence du cancer du sein après traitement

Après avoir été traitée, la patiente doit être régulièrement suivie. En dépit des excellents traitements, la récurrence du cancer loco-régionale ou à distance peut avoir lieu. En effet, après une période de 10 ans post-traitement, une récurrence loco-régionale de la tumeur est observée dans 56% des cas, alors que des métastases à distance apparaissent chez 9% des patientes. Cette étude s'attardera principalement sur l'implication des MMPs dans le processus de récurrence.

Les proMMPs peuvent être activées par des protéases et par de très faibles concentrations d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$),

induisant le clivage du propeptide des proMMPs (OKAMOTO et al., 1997; PAQUETTE et al., 2003; RAJAGOPALAN et al., 1996; SHAUGHNESSY et al., 1993). En effet, il est suggéré que ces espèces peuvent dissocier le lien formé par la cystéine et l'atome de zinc conduisant à un autoclivage du propeptide et au relâchement de la MMP active (OKAMOTO et al., 1997; SAARI et al., 1990). Ces mêmes espèces réactives à l'oxygène qui activent les MMPs peuvent aussi être produites par les radiations pendant la radiothérapie. En effet, l'hypothèse qui est proposée met l'accent sur le double rôle des radiations, c'est-à-dire de détruire les cellules cancéreuses du sein ou de faciliter leur invasion. Les patientes sont exposées à des radiations quotidiennes par fractions de 2Gy pour une dose totale de 50 à 66Gy. Avec chaque traitement de 2Gy, seulement une fraction des cellules sera tuée tandis que la capacité d'invasion des cellules survivantes pourrait être augmentée.

La radiothérapie améliore le taux de guérison, mais ce type de traitement pourrait aussi favoriser l'invasion des cellules cancéreuses du site initial vers les tissus sains avoisinants en activant certaines proMMPs. Déjà en 1949, l'équipe de Kaplan et Murphy a mené la première étude expérimentale d'envergure et a mis en lumière l'existence d'une augmentation de la fréquence de formation de métastases des suites de l'irradiation locale d'une tumeur et la présence de métastases dans des tissus normaux préalablement irradiés (KAPLAN et MURPHY, 1949). D'autres équipes ont observé des récurrences locorégionales ou à distance après traitement par irradiation d'une tumeur primaire (DAO et YOGO, 1967 ; NATHANSON et al., 1989 ; VON ESSEN, 1991).

D'autre part, de très faibles concentrations d'espèces réactives à l'oxygène peuvent également agir comme second messager et ainsi d'augmenter l'expression des MMPs (SCHENK et al., 1994). Des expériences avec des cellules endothéliales incubées avec du H₂O₂ ont démontrés que les expressions de la MMP-2 et de la MMP-9 ont augmentées (BELKHIRI et al., 1997). De plus, les O₂^{•-} générés par le système xanthine/xanthine oxydase accroissent le niveau d'expression de la MMP-2 synthétisée par les fibroblastes (KAWAGUCHI et al., 1996). Mais jusqu'à présent, le lien entre les radicaux libres formés par la radiothérapie et l'augmentation de l'invasion, l'activation directe de proMMPs et l'augmentation de l'expression de certaines MMPs après irradiation de la BM n'est pas encore connu.

3- Les estrogènes

Les estrogènes font partie de la classe des hormones stéroïdes (GREENSPAN et al., 1994). Bien qu'elles soient présentes à la fois chez la femme et chez l'homme, elles sont retrouvées en quantité plus importante chez la femme puisqu'elles sont principalement synthétisées par les ovaires. Ces hormones sont essentielles pour le développement du caractère physiologique féminin. D'autres tissus ont aussi la capacité de produire certains estrogènes mais en plus petites

quantités, tels le foie, la surrénale, les seins et les tissus adipeux. Ces sources secondaires sont très importantes lors de la période de post-ménopause.

3-1 L'estradiol

L'estradiol, qui est l'estrogène principal, est la plus active des trois hormones œstrogéniques de l'organisme qui regroupe aussi l'estrone et l'estriol. Elle est libérée après la stimulation par une autre hormone (l'hormone folliculostimulante lutéinisante : FSH et LH) sécrétée par l'hypophyse. Son taux est variable au cours de la vie d'un individu. Jusqu'à la puberté, il est relativement bas, puis s'élève dès l'arrivée des cycles menstruels.

3-2 Effets bénéfiques

Des études ont démontré que les estrogènes soulagent les symptômes de la ménopause (HAMMOND et MAXSON, 1986) et jouent un rôle crucial dans la prévention de l'ostéoporose. Toutefois, la thérapie d'hormone de remplacement suscite une grande controverse pour ce qui a trait à son apport bénéfique pour diminuer l'incidence des maladies cardio-vasculaires chez la femme postménopausée. Selon les équipes de Bush et Gruchow, les femmes préménopausées ont un taux de maladies cardio-vasculaires plus faible comparativement aux hommes et femmes postménopausées du même âge, indiquant que les estrogènes pourraient avoir un rôle protecteur contre l'athérosclérose (BUSH et al., 1987; GRUCHOW et al., 1988). Mais récemment,

selon l'équipe de Cho, ayant réalisée une méta-analyse des résultats de cinq études cliniques de grande envergure regroupant au total plus de 20000 patientes, il n'y a aucun bénéfice à administrer une telle thérapie. En effet, il a été démontré que ce type de thérapie ne réduisait pas le taux de mortalité par maladies cardiovasculaires des femmes postménopausées. Cette méta-analyse suggère ainsi que la thérapie d'hormone de remplacement n'est pas une mesure de prévention de deuxième ligne efficace pour éviter les maladies cardiovasculaires chez les femmes postménopausées (CHO et MUKHERJEE, 2005).

3-3 Effets néfastes – estrogène et cancer du sein

Différents facteurs augmentent l'incidence du cancer du sein. Un de ces facteurs consiste en une exposition prolongée à l'estrogène. En effet, cette hormone favorise la prolifération des cellules épithéliales du sein. Cette prolifération rapide rend ces cellules plus sensibles à des erreurs de réplication de leur ADN. L'accumulation de ces mutations peut conduire à leur conférer un caractère malin (ROGAN et al., 2003). Autre fait important, dans quasiment tous les types de cancers du sein, le métabolisme de l'estradiol est altéré. Ces modifications entraînent une accumulation de métabolites appelés hydroxyestrogènes qui sont capables de générer des radicaux libres, comme le radical hydroxyle.

3-3-1 Stress oxydatif et espèces réactives à l'oxygène

L'apparition d'un stress oxydatif est basée sur un déséquilibre entre les espèces réactives à l'oxygène et les antioxydants présents. Les espèces majoritairement produites sont le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

3-3-2 Métabolites de l'estradiol et réaction de Fenton

Les métabolites toxiques de l'estradiol qui s'accumulent sont les 2- et 4-hydroxyestrone (2- et 4-OHE₁) et les 2- et 4-hydroxyestradiol (2- et 4-OHE₂), aussi appelés les hydroxyestrogènes (Fig. 5). Ces métabolites peuvent générer des radicaux libres. La 4-OHE₂ est le métabolite qui est le plus efficace à générer des radicaux libres (PAQUETTE et al., 2004).

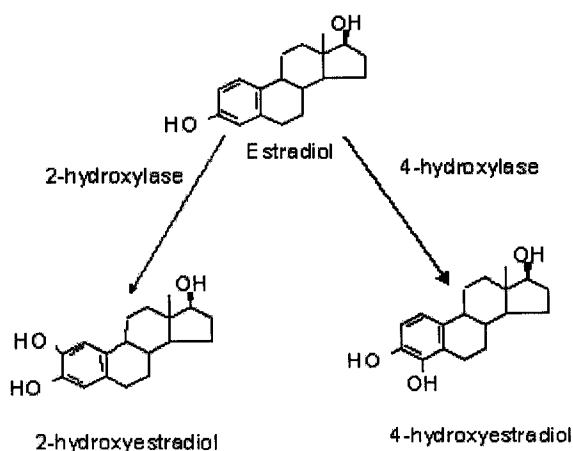


Figure 5. Formation des métabolites de l'estradiol : 2- et 4-hydroxyestradiol.

Suivant différents modèles proposés dans la littérature, un composé catéchol tel que la 4-OHE₂ peut être converti en forme semiquinone de l'estrogène en présence d'ions métalliques de transition (Fig. 6) et agir comme des donneurs d'électrons à cause de la présence de ses deux groupements hydroxyles sur les carbones adjacents de son anneau benzène A (Fig. 5). Un deuxième électron peut être transféré à l'oxygène (O₂) produisant ainsi la forme quinone de l'estrogène et le radical O₂^{•-}. Ce radical libre peut être dismuté en H₂O₂ de façon spontanée ou par l'entremise de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). La réaction de Fenton peut donc se réaliser en présence de Cu²⁺ ou Fe²⁺ pour produire le radical HO[•].

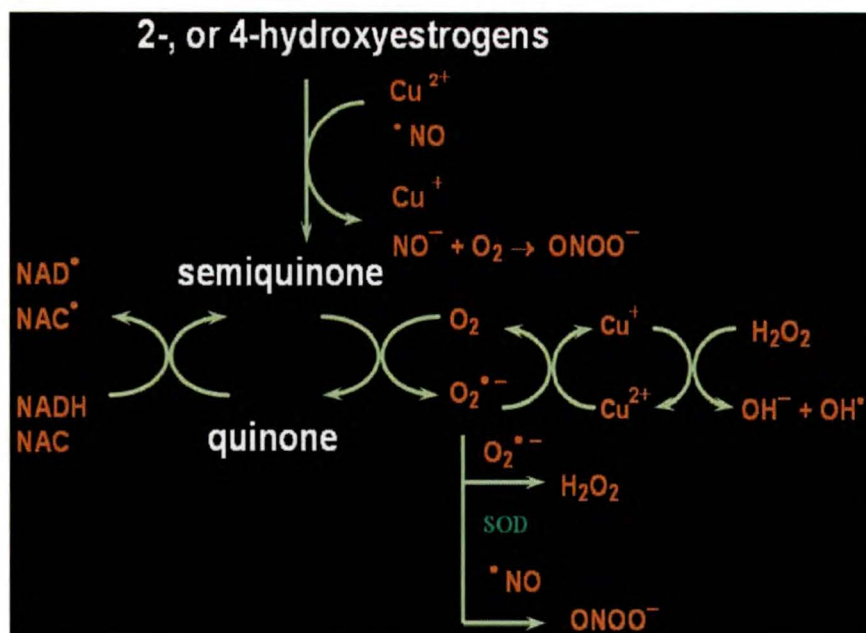


Figure 6. Formation de radicaux libres par les hydroxyestrogènes

3-4 Stress oxydatif et invasion

De nombreuses études ont été réalisées sur le phénomène d'accumulation des métabolites de l'estradiol et sur les conséquences que cela engendre (ABUL-HAJJ et CISEK, 1988 ; CLEMONS et GOSS, 2001 ; LIEHR et RICCI, 1996 ; REED et al., 1989 ; ROGAN et al., 2003). Ces études se sont principalement penchées sur leur effet mitotique et leur capacité à causer des mutations génétiques par le biais des radicaux libres et ainsi induire la formation d'une tumeur. Mais d'autre études, moins nombreuses, mettent en exergue leur capacité à activer des proMMPs par les radicaux libres qu'elles ont générées (KAWAGUCHI et al., 1996 ; PAQUETTE et al. 2004) et de part là même augmenter la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein. Aussi, un stress oxydatif peut être à l'origine de l'agressivité d'une tumeur en augmentant l'expression de certaines MMPs puisque dans presque sinon tous les cancer du sein le métabolisme de l'estradiol est altéré (BALDUYCK et al., 2000 ; KAWAGUCHI et al., 1996). Mais, le mécanisme qui permet de mettre en relation stress oxydatif généré par ces hormones et augmentation de l'expression et de l'activation de MMPs clés dans l'invasion n'est pas connu

3-5 But et objectifs spécifiques

Le but de cette étude est de déterminer le rôle d'un stress oxydatif induit par la 4-hydroxyestradiol ou l'irradiation gamma dans l'augmentation de l'expression des MMPs.

Ce projet de recherche s'articule suivant 3 objectifs spécifiques. Le premier objectif consiste à déterminer la contribution effective des radiations à augmenter la capacité d'invasion de cellules cancéreuses du sein. Le second objectif lui se penche sur l'implication d'un des métabolites de l'estradiol, la 4-OHE₂ dans ce phénomène d'invasion. Le troisième est de vérifier l'existence d'une synergie des effets précédemment étudiés.

Par le biais de ces trois objectifs, cette étude permettra dans l'avenir de mieux comprendre quelles sont les causes effectives de la récurrence du cancer du sein et placera des jalons pour un meilleur traitement du cancer.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- Mise en solution des hormones

La 4-OHE₂ (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) et la 4-MeOE₂ (Steraloids, New Port, RI) ont été solubilisées dans de l'éthanol 100% à une concentration de l'ordre de 10⁻²M pour être ensuite diluées à une concentration finale de 10⁻⁸M dans du Mammary Epithelium Basal Medium (MEBM) (Clonetics, Walkersville, MD). La concentration initiale en hormone a été déterminée par dosage au spectrophotomètre U-2000 (HITACHI Ltd., Tokyo) en utilisant le coefficient d'absorption molaire $\epsilon = 2138 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

2- Culture cellulaire en monocouche

Les lignées cellulaires de tumeurs mammaires humaines MDA-MB-231 et MCF-7 (ATCC, Manassas, VA) ont été étudiées. Les cellules, conservées dans des vials placés dans de l'azote liquide ont été mises en culture dans un flacon de 25 cm² (T25) contenant du Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma, St-Louis, MO)

enrichi avec 1mM de pyruvate sodium, 2mM de L-glutamine, 1µg/ml de streptomycine, 1U/ml de pénicilline, 0,25µg/ml d'amphotéricine B et 10% de sérum foetal bovin (FBS) (INVITROGEN - GIBCO BRL, Burlington, ON), mais sans insuline; qui sera désormais désigné par l'appellation MEM complet. Les cellules ont été incubées à 37°C sous atmosphère de 5% CO₂ et 95% air jusqu'à une confluence de 80%. Les cellules ont alors été décollées à l'aide d'une solution enzymatique de pancréatine 2,5% (Sigma, St-Louis, MO), réensemencées dans des flacons de 75 cm² (T75) et utilisées lorsque la confluence atteignait de 30-50%.

3- Traitement des cellules sur Matrigel™

Le BD Matrigel™ Standard Growth Factor sans rouge phénol (BD Biosciences, Oakville, ON) est une matrice extracellulaire artificielle préparée à partir de sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm. Deux plaques de 6 puits ont été utilisées. Au fond de chacun des puits, le Matrigel™ a été déposé un volume final de 500µl de dilué 1:1 (concentration finale: 8,1mg/ml) dans du MEM sans «bovine pituitary extract» (PBE). Les plaques ont alors été confinées 1h à 37°C pour permettre au Matrigel™ de polymériser. Pendant l'incubation, des cellules MDA-MB-231 ou MCF-7 ont été récoltées à l'aide d'une solution non enzymatique, le Cell Dissociation Solution (Sigma, St-Louis, MO, n° de catalogue : C-5914) et centrifugées à 1300 rpm à T.P. pour être resuspendues

dans un volume final de 3mL de MEM complet. Puis, le Matrigel™ recouvert de 1,5ml de tampon NaCl et phosphate (PBS) a été irradié à 0 ou 20Gy à l'aide d'une source de ^{60}Co équipant une GammaCell 220 (MDS Nordion, Ottawa, ON). Le PBS enlevé, 6×10^5 cellules par puits dans du MEM complet ont étéensemencées pour qu'elles adhèrent au Matrigel™ en monocouche pendant 3h. À la fin de ce temps d'incubation, les cellules ont été lavées deux fois au PBS pour enlever les résidus de FBS puis incubées dans du MEBM complet (Clonetics, Walkersville, MD), c'est-à-dire contenant 156µg/ml de BPE, 10ng/ml de human epidermal growth factor (hEGF), 0,5µg/ml d'hydrocortisone, 50µg/ml de gentamicine et d'amphotérécine B (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD). Les cellules ont été incubées avec soit la 4-OHE₂ à 10^{-8}M , l'ÉtOH à 0,0001% (contrôle négatif) ou le H₂O₂ 10µM (contrôle positif) pendant 18h. Le changement de milieu, MEM pour MEBM, est important puisque le MEBM est optimisé pour la croissance des cellules épithéliales mammaires et dépourvu de proMMPs qui pourraient interférer avec nos résultats.

4- Chambres d'invasion

Les chambres d'invasion constituaient un système adéquat pour étudier le phénomène d'invasion. Caractérisées par un montage particulier, elles permettent de déterminer le pourcentage d'invasion d'une lignée cellulaire. Dans chaque puits est placé une sorte de panier suspendu dont le fond est constitué

d'une membrane poreuse de 8µm recouverte de Matrigel™. Le panier en question ne touche pas au fond du puits. Le fond du puits est recouvert de milieu à chimioattractant (MEM complet), tandis que le panier contient les cellules à étudier en suspension dans du milieu MEM contenant 0,1% de «Bovine Sérum Albumine» (BSA). Des chambres d'invasion recouvertes de Matrigel™ ont été réhydratées avec 0,5 ml de MEM contenant 0,1% BSA de pendant 1 h à 37°C. Avant ensemencement des cellules, certaines chambres ont été irradiées à des doses de 2 à 20 Gy. Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (1×10^4 ou 4×10^4) ont été récoltées à l'aide de 1 ml de «Cell Dissociation Solution» incubées pendant 10 min à température de la pièce. Puis, les cellules ont été lavées avec du PBS, suspendues dans 0,5 ml de MEM contenant 0,1% de BSA, ensemencées dans des chambres d'invasion et incubées à 37°C de 6 à 36h.

Dans un autre essai, les cellules cancéreuses du sein ont été traitées dans les chambres d'invasion avec 1 mM d'inhibiteur de MMP-2 (2R)-[(4-biphenylsulfonyl)amino]-N-hydroxy-3-phenylpropionamide. Comme chimioattractant, le milieu MEM supplémenté avec 10% de FBS a été ajouté au compartiment inférieur de la chambre d'invasion. Les cellules qui ont migrées au travers du Matrigel™ et ayant traversées la membrane poreuse, ont été fixées et colorées avec 0,5% de cristal violet pour être comptées au microscope. Chaque condition d'expérience a été réalisée 4 fois.

5- Gel de zymographie

Des cellules en croissance exponentielle sur Matrigel™ traitées avec ou sans la 4-OHE₂ dans du milieu MEBM ont été incubées pendant 18h. Le milieu de culture a été récupéré et concentré 30 fois via des colonnes Centricon YM30 (Millipore, Etobicoke, ON) par centrifugation de 5 min à 750 rpm et à 4°C pour récupérer les protéines MMP-2 et -9 libérées par les cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Le contenu protéique de ces échantillons a été dosé à l'aide de l'essai de Bio-Rad, standardisé puis migré dans un gel de 12% acrylamide SDS-PAGE non réducteur à 150Volts pendant 3h à 4°C. Ce gel de zymographie contenait 0,1% de gélatine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), un substrat des MMP-2 et -9. Cette analyse permet de distinguer et de quantifier les formes proMMP et MMP qui migrent suivant leur poids moléculaire. Après la migration, le SDS a été retiré du gel en incubant ce dernier à température pièce sous agitation modérée pendant 30 min dans 2,5% de Triton X-100. Ensuite, le gel a été incubé pendant 18h dans une solution de 50mM de Tris-HCl, pH 7,5 contenant 200mM NaCl, 5mM CaCl₂ et 0,02% Brij 35 puis coloré à l'aide d'une solution colorante composée de 0,1% bleu de Coomassie, 40% de méthanol et 10% d'acide acétique. Des préparations commerciales de 0,025µg des proMMP-2 et proMMP-9 (Calbiochem, San Diego, CA) ont servi de contrôles positifs pour voir sous quelles formes se retrouvaient les MMPs dans le milieu conditionné. Ces proMMPs ont été incubées avec 1 mM d'acetate de p-aminophenylmercurique (APMA) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) pour 2h à 37°C dans leurs tampons de réaction afin de les convertir en MMPs. Le

tampon de réaction A pour la proMMP-9 était composé de 100mM Tris pH 7,6, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 1µM ZnCl₂ et 0,01% Brij 35 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Le tampon de réaction 2 pour la proMMP-2 était composé de 0,05M borate pH 7,5, 5mM CaCl₂, 20% Glycérol, 0,005% Brij 35 et 0,01mM ZnCl₂. L'eau des tampons a été traitée avec de la résine chelex® 100 (BIO-RAD, Hercules, CA).

6- siRNA

6×10^5 cellules/puits ont étéensemencées sur plastique dans 3ml de MEM complet. Après une incubation de 24h, les cellules ont été rincées avec du PBS pour enlever les résidus de FBS du milieu et un volume de 2,3ml de MEM complet a été ajouté à chaque puits. La transfection consistait à introduire dans la cellule de petits ARN antisens complémentaires à des ARNm spécifiques. Cette technique permet d'inhiber la production protéique de gènes étudiés en dégradant les ARNm correspondants. Les siRNA et leurs amorces PCR respectifs commandés chez QIAGEN sont présentés dans le tableau 3. Un volume de 0,6µl des siRNA correspondant à la MT1-MMP, au contrôle positif MAPK1, au contrôle négatif «non-silencing» (QIAGEN, Mississauga, ON) a été dilué avec 99,4µl de MEM complet sans sérum pour un volume final de 100µl. L'agent de transfection HiPerfect (18µl) (QIAGEN, Mississauga, ON) a ensuite été ajouté et le tout a été vortexé et incubé 15 min à la température de la pièce pour permettre la formation de complexes de transfection sous forme de micelles.

Ce mélange a ensuite été ajouté goutte-à-goutte à des cellules en adhérence dans des plaques 6 puits puis incubé 48h pour transfection. Un contrôle siRNA a été effectué.

Tableau 3. Séquences des siRNA et des amorces utilisés pour la transfection

Nom	sens	antisens
Mm/Hs MAPK1 control siRNA	ugcugacuccaaagcucu gdttdt	Cagagcuuuggagucagca dtdt
Hs MT1-MMP HP siRNA	r(cagcgggucuaggaauuc aa)dtdt	r(uugaauuccuagaccgcu g)dtdc
Control (non-silencing) GFP-22	n.d.	n.d.
Hs MAPK1 SG 1 QuantiTect Primer Assay (QT00065933)	n.d.	n.d.
Hs MT1-MMP SG 1 QuantiTect Primer Assay (QT00001533)	n.d.	n.d.

n.d. non disponible, mais l'amplicon de MAPK1 a une longueur de 134pb et l'amplicon de MT1-MMP a une longueur de 118pb.

7- Isolation de l'ARN total

La dissociation des cellules du Matrigel™ a été effectuée à l'aide du «Cell Recovery solution» obtenu chez BD Biosciences (Oakville, ON, Canada) puis l'ARN total a été isolé à l'aide du «RNeasy® Mini kit» (QIAGEN, Mississauga, ON) suivant les directives des fournisseurs. L'ARN recueilli a été dilué dans de l'eau traitée avec 0,1% de diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) ou de l'eau sans RNase fournit par le kit de QIAGEN et dosé au spectrophotomètre U-2000 (HITACHI Ltd., Tokyo) ou au spectrofluorimètre

Synergy HT (BIO-TEK instruments, inc., Winooski, VT) à 260nm et 280nm. La pureté a été évaluée en tenant compte de l'absorbance théorique de 1 unité de densité optique d'ARN à 260 nm pour 40 µg/ml. De plus, seuls les échantillons dont le ratio de l'absorbance de 260 nm / 280 nm était compris entre 1,8 et 2,0 ont été conservés. L'intégrité de l'ARN total purifié a aussi été vérifiée en réalisant une électrophorèse sur gel d'agarose 1,8% avec détection au colorant fluorescent SYBR Green I® (Molecular Probes, Burlington, ON) à 500 nm. Les échantillons ont été jugés non dégradés lorsque les 2 bandes caractéristiques d'ARN ribosomal (28S de 5,0kb et la 18S de 1,9kb) étaient visualisées au transilluminateur model TC-302 (SPECTROLINE®, Westbury, NY).

8- Traitement à la DNase

Les échantillons d'ARN extraits ont été traités avec le kit «Amplification Grade DNase» (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) suivant les directives du fournisseur afin d'éliminer l'ADN génomique résiduel qui pourrait nuire à l'amplification par PCR.

9- RT-PCR

La transcription inverse (RT) des ARNs (1µg) a été réalisée avec de l'enzyme transcriptase inverse M-MLV (200U/20µl) (BIOCAN Scientific Inc., Mississauga, ON) en présence de l'inhibiteur de RNase RNAGuard™ (2U/20µl) (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC), du pd(N)6 (100pmol/µl) et des dNTPs (10mM) (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). Des co-amplifications avec le contrôle interne GAPDH ont été exécutées avec 50 ng d'ADNc dans un thermocycler PX2 (ThermoHybaid, Ashford Middlesex, UK) en 30 cycles pour la MT1-MMP et la TIMP-2 avec leurs amorces spécifiques (voir tableau 4 pour les séquences des amorces) à 10pmol/µl. Pour l'amplification du fragment de 474pb du gène MMP-2, une PCR de type «Touchdown» a été réalisée avec 100ng d'ADNc en 35 cycles : 30 sec 94°C, (1 min 94°C, 30 sec 60°C, 1 min 72°C) pour 9 cycles, (1 min 94°C, 30 sec 60°C {- 0,5°C/cycle}, 1 min 72°C) pendant 17 cycles, (1 min 94°C, 30 sec 52°C, 1 min 72°C) pour 10 cycles. L'amplification du fragment de 307pb ciblant le gène du contrôle interne GAPDH a été réalisée séparément mais avec les mêmes conditions Touchdown PCR qu'utilisées pour amplifier le fragment de la MMP-2. L'enzyme Taq Polymérase était utilisée à une concentration de 2,5U/50µl (Fisher Scientific Ltd., Nepean, ON) avec des tampons PCR 10X où étaient ajoutés 2mM de dNTPs et MgCl₂ 2,5mM pour MT1-MMP alors que pour la TIMP-2 la concentration de MgCl₂ était de 1,5mM. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,8% avec détection au colorant fluorescent SYBR Green I® (Molecular Probes,

Burlington, ON) à 500 nm. La visualisation a été faite à l'aide d'un appareil STORM® 860 qui couple un scanner et un logiciel d'analyse d'images, ImagQuant™ (Molecular Dynamics, Inc., Baie d'Urfé, QC).

Tableau 4. Amorces de PCR et longueurs de produits d'amplification.

Nom	Séquence		Ampli- con (pb)	Référence
	amorce sens	amorce antisens		
MMP-1	ATTGGAGCAGCAA GAGGCTGGGA	TTCCAGGTATTT CTGGACTAAGT	183	(Balduyck et al., 2000)
MMP-2	GGCCCTGTCACTC CTGAGAT	GGCATCCAGGT TATCGGGGA	474	(Clarke, 2001)
MMP-2 CS-P	CGCTCAGATCCGT GGTGAG	TTGTCACTGGC GTCACAG	71	(Strup-Perrot et al., 2004)
MMP-3	GCATAGAGACAAC ATAGAGCT	TTCTAGATATTT CTGAACAAGG	155	(Balduyck et al., 2000)
MMP-9	TGGACGATGCCT GCAACGTG	GTCGTGCGTGT CCAAAGGCA	455	(Clarke, 2001)
MMP-13	TGCTGCATTCTCC TTCAGGA	ATGCATCCAGG GGTCCTGGC	184	(Balduyck et al., 2000)
MT1-MMP	CGCTACGCCATCC AGGGTCTCAA	CGGTCATCATCG GGCAGCACAAA A	496	(Daja et al., 2003)
TIMP-1	CTTCCACAGGTCC CACAACC	CAGCCCTGGCT CCCGAGGC	303	(Balduyck et al., 2000)
TIMP-2	GGTCTCGCTGGA CGTTGGAG	GGAGCCGTCAC TTCTCTTG	303	(Balduyck et al., 2000)
TIMP-3	CGCTGGTCTACAC CATCAAGC	CAGGAGGATAG TTCCCAATAAAC C	637	(Balduyck et al., 2000)
TIMP-4	CAGTGAGAAGGT AGTTCCGGCC	TCTTATTAGCTG GCAGCAAGAGG	636	(Balduyck et al., 2000)
GAPDH	CGGAGTCAACGG ATTTGGTCGTAT	AGCCTTCTCCAT GGTGGTGAAGA C	307	(Clarke, 2001)
452 GAPDH	ACCACAGTCCATG CCATCAC	TCCACCACCCTG TTGCTGTA	452	(Goidin et al., 2001)

10- Real-Time PCR

Les mêmes amorces et conditions utilisées lors des RT-PCR ont été utilisées, sauf pour le nombre de cycles (Tab. 4). Ces Real-Time PCR ont été réalisés à l'aide du kit Quantitect™ SYBR® Green PCR. Avec ce kit, tous les programmes de PCR commencent par 15 min. à 95°C, un hot start, pour activer l'enzyme HotStarTaq® ADN polymérase et sont suivis d'une courbe de fusion pour vérifier le spécificité des amorces (Tab. 5).

Tableau 5. Conditions des Real-Time pour les amorces utilisées

nom	T° dénaturation	T° d'hybridation	T° d'élongation
MMP-1	94°C 30sec	58°C 30sec	72°C 1min
MMP-2 CS-P	94°C 30sec	52°C 45sec	72°C 1min
MMP-3	95°C 30sec	50°C 30sec	72°C 1min
MMP-13	94°C 30sec	58°C 45sec	72°C 1min
TIMP-1			
TIMP-3			
TIMP-4			
MT1-MMP	94°C 30sec	62°C 30sec	72°C 1min
TIMP-2	94°C 50sec	55°C 50sec	72°C 20sec
GAPDH			
MAPK1	94°C 30sec	52°C 50sec	72°C 1min
MT1-MMP			

11- L'activité de la MMP-2 à la surface des cellules cancéreuses du sein

L'activité de la MMP-2 des cellules MDA-MB-231 ensemencées sur du Matrigel™ irradié à 20 Gy a été mesurée après incubation de 18 h à 37°C dans du MEM 0,1% de BSA. Ce milieu a été remplacé par du tampon A, un tampon spécifique à l'enzyme MMP-2. L'activité de la MMP-2 a été mesurée au spectrofluorimètre aux longueurs d'ondes d'excitation de 340nm et d'émission de 485nm en ajoutant le peptide fluorogénique MMP Substrat III, le (2R)-[(4-biphenylsulfonyl)amino]-N-hydroxy-3-phenylpropionamide (Calbiochem San Diego, CA). Les valeurs sont significativement différentes pour $p = 0,0006$.

12- Analyse statistique

Chaque essai a été répété 3 à 6 fois. Les données ont été exprimées en moyenne \pm écart-type. Lorsque cela s'appliquait, un test t de Student a été réalisé.

RÉSULTATS

1- Les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7

Pour toutes les expériences réalisées lors de cette étude, deux lignées cellulaires ont été testées et comparées: les cellules MDA-MB-231 qui sont hautement métastatiques et n'expriment pas de récepteurs à estrogène et des cellules faiblement métastatiques, les MCF-7 qui elles sont récepteurs à estrogène positives. Elles proviennent toutes deux de patientes ayant eu une effusion pleurale. (BACHMEIER et al., 2005)

2- Effet de l'irradiation

2-1 L'irradiation gamma augmente la capacité d'invasion des cellules MDA-MB-231

Des chambres d'invasion ont été utilisées pour déterminer si l'exposition de la membrane basale aux radiations gamma peut augmenter la capacité d'invasion

des cellules cancéreuses du sein. Les chambres d'invasion contiennent une membrane poreuse ayant les pores ont 8µm de diamètre et qui est recouvert de Matrigel™ (MB artificielle). L'expression et l'activation des proMMPs conduisent à une digestion du Matrigel™ permettant aux cellules cancéreuses de migrer au travers de la membrane. Avant tout ensemencement, les chambres d'invasion ont été irradiées en utilisant une source de ^{60}Co aux doses indiquées.

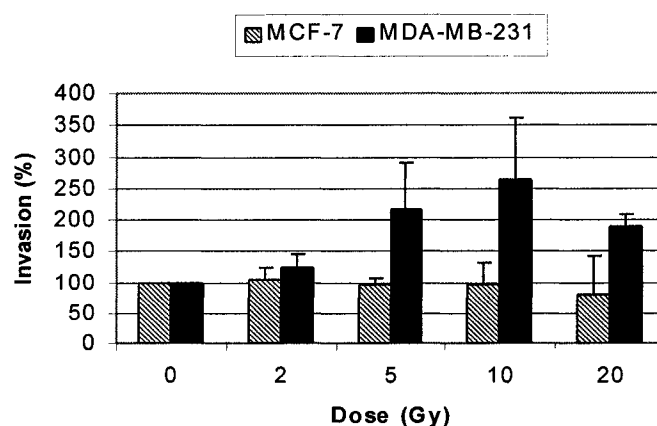


Figure 7. Effet de l'irradiation du Matrigel™ sur la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein. Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées en monocouche sur du Matrigel™ irradié de 0 à 20Gy puis incubées pendant 6 h. Le nombre de cellules ayant traversées la MB artificielle a été compté et normalisé selon le nombre de cellules invasives mesuré avec le contrôle non irradié. Un pourcentage d'invasion a ainsi été calculé.

Les résultats montrés à la figure 7 ont été normalisés en fonction du nombre de cellules qui ont migrées au travers du Matrigel™ non irradié. Nos résultats ont démontrés que l'exposition du Matrigel™ à des doses de 2 à 20Gy avant ensemencement de cellules cancéreuses du sein a remarquablement augmenté la capacité d'invasion des cellules MDA-MB-231. Une augmentation

maximale de 2,6 fois a été observée à 10Gy en comparaison avec les chambres d'invasion non irradiées (0 Gy vs 10 Gy: $p = 0.02$). D'un autre côté, aucune augmentation de l'invasion n'a été observée avec les cellules MCF-7, faiblement métastatiques (Fig.8).

2-1-1 La concentration cellulaire influence l'invasion

L'augmentation de l'invasion des cellules cancéreuses du sein induite par la radiation était dépendante de la concentration de cellules testées (Fig.8). Les résultats pour chaque concentration ont été normalisés suivant leurs contrôles respectifs obtenus lorsque les chambres d'invasion n'étaient pas irradiées. Pour une concentration de 1×10^4 cellules de MDA-MB-231 par 0,5ml de milieu, ensemencées dans une chambre d'invasion irradiée, il en est résulté une augmentation de l'invasion de 2,1 fois à 5Gy comparativement à son contrôle non irradié. Cette stimulation induite par l'irradiation du Matrigel™ était encore plus marquée lorsque 4×10^4 cellules par 0,5ml de milieu ont été ensemencées résultant en une augmentation de 7,5 fois.

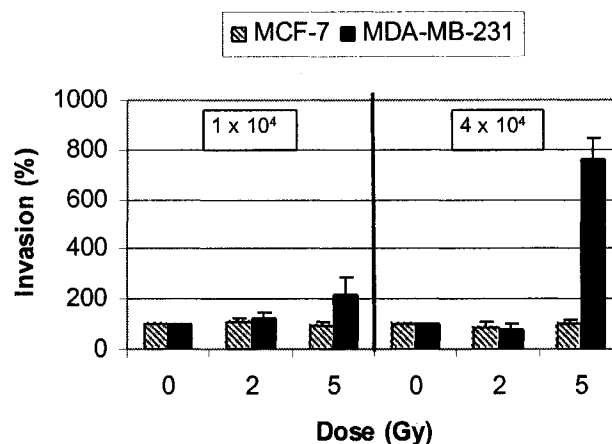


Figure 8. Effet de la concentration des cellulesensemencées sur du Matrigel™ sur l'invasion. Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont étéensemencées en monocouche sur du Matrigel™ irradié de 0 à 5 Gy puis incubées pendant 6 h. Le contrôle non irradié a servi de valeur de base (100%) pour toute comparaison avec les autres conditions. 1 x 10⁴ cellules MDA-MB-231 – 0Gy vs 5Gy : p=0,05 et 4 x 10⁴ cellules MDA-MB-231 – 0Gy vs 5Gy : p=0,01.

Comme il a été précédemment constaté, l'augmentation de l'invasion a été observée seulement avec la lignée cellulaire MDA-MB-231 puisque aucune augmentation n'a été obtenue pour les cellules MCF-7.

2-1-2 Les radiations ionisantes induisent le relâchement de facteurs emmagasinés dans la MB qui augmente l'invasion de cellules cancéreuses du sein

Les radiations ionisantes peuvent directement ou indirectement induire des modifications à la MB via l'action de radicaux libres générés durant la radiolyse de l'eau. Pour démontrer l'importance de cette voie, les chambres d'invasion ont été irradiées avec ou sans PBS sur le Matrigel™ (Tab. 6). L'irradiation des chambres d'invasion sans ajout de PBS avant ensemencement a quadruplé le

nombre de cellules MDA-MB-231 qui a traversé le Matrigel™ comparativement au nombre obtenu avec les chambres non irradiées.

Tableau 6. Effet de l'irradiation du Matrigel™ sur l'invasion des cellules MDA-MB-231.

#	Dose (Gy)	Conditions	Moyenne du nombre de cellules migrant au travers du Matrigel™ (E.T.) ¹
1	0	Pas d'irradiation	6,3 (±2,3)
2	10	Chambres d'invasion irradiées sans PBS	24,0 (± 9,6)
3	10	Chambres d'invasion irradiées avec PBS	54,0 (± 13,0)
4	0	PBS enlevé après irradiation de chambres d'invasion puis ajouté à des chambres d'invasion non irradiés avant ensemencement des cellules	57,0 (± 28,6)

Les chambres d'invasion ont été traitées comme indiquées. Les cellules MDA-MB-231 (1×10^4) ont été ajoutées après irradiation des chambres d'invasion et incubées pendant 6h dans du MEM 0,1% BSA. Condition #1 vs condition #2, $p = 0,05$; condition #2 vs condition #3, $p = 0,02$; condition #3 vs condition #4, $p = 0,49$. ¹Moyenne du nombre de cellules invasives observées au microscope \pm l'écart-type ; condition #1 vs condition #4, $p = 0,01$.

Cette augmentation était d'autant plus importante lorsque les chambres étaient recouverte de PBS durant l'exposition aux rayons gamma, toujours en comparaison avec les chambres non irradiées, puisqu'une augmentation de 8,5 fois a été observée. Ces résultats suggèrent que les radiations ionisantes peuvent induire certaines modifications à la MB qui induisent une augmentation de la capacité d'invasion des cellules MDA-MB-231.

2-2 Rôle clé de la MMP-2 dans l'invasion

La détection d'un niveau élevé de MMP-2 a été associée à l'agressivité et à un faible pronostic du cancer du sein (DUFFY et al., 2000 ; HANEMAAIJER et al., 2000 ; POULSOM et al., 1993). De plus, cette enzyme fait partie des MMPs surexprimées dans les cancers du sein et donc plus facile à quantifier (KOUSIDOU et al. 2004 ; BALDUYCK et al., 2000). Dans cette étude, le rôle de l'irradiation dans le relâchement de la MMP-2 emmagasinée dans la MB a été analysé. Après irradiation, le PBS recouvrant le Matrigel™ a été transféré dans des chambres d'invasion non irradiées. Les cellules MDA-MB-231 ont alors été ajoutées et le nombre de cellules qui a traversé le Matrigel™ a été comptabilisé. Tel que présenté dans le tableau 6, le PBS isolé du Matrigel™ irradié a augmenté de plus de 8 fois le nombre de cellules MDA-MB-231 qui a migré à travers le Matrigel™, comparativement aux chambres d'invasion non irradiées. Ces données suggèrent que les radiations ionisantes peuvent induire le relâchement de facteurs stockés dans la MB ce qui augmenterait la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein de MDA-MB-231.

Afin de confirmer l'implication potentiel de la MMP-2, un gel de zymographie a été réalisé sur des échantillons de PBS isolés du Matrigel™ irradié. La zymographie est un gel non réducteur d'acrylamide polymérisé avec un substrat à la MMP-2, la gélatine. Cet essai permet de distinguer le zymogène de l'enzyme de sa forme active qui migrent suivant leurs poids moléculaires. Après migration, le gel est incubé dans des conditions appropriées qui permettent

à la proMMP et la MMP des digérer la gélatine localement. Les aires digérées par les métalloprotéinases de matrice apparaissent sous forme de bandes claires après coloration au bleu de Coomassie. Même si une quantification est difficilement réalisable avec le gel de zymographie, nos résultats supportent l'idée que l'irradiation du Matrigel™ à 20Gy a conduit à une augmentation du relâchement de la MMP-2 emprisonnée dans le Matrigel™ (Fig. 9).

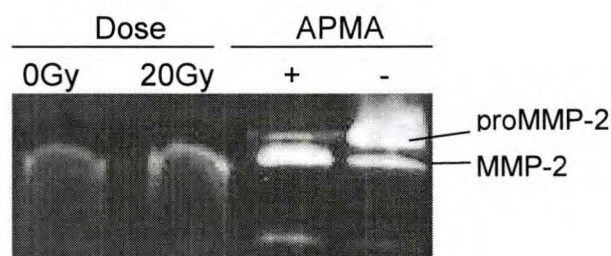


Figure 9. Relâchement de la MMP-2 emmagasinée dans le Matrigel™. Le Matrigel™ recouvert de 0,5ml de PBS a été irradié (20Gy) ou non. Le PBS conditionné a été recueilli puis analysé par gel de zymographie contenant un substrat des MMP-2 (la gélatine). Le contrôle proMMP-2 obtenu de Calbiochem (San Diego, CA) a été activé avec de l'APMA (1mM) et les formes activée et inactivée ont été ajoutées au gel.

2-2-1 L'expression de la MMP-2 issue des cellules cancéreuses du sein stimulée par l'irradiation de la MB.

Puisque les cellules cancéreuses interagissent étroitement avec les protéines de la MB, nous avons cherché à déterminer si l'augmentation de la capacité d'invasion était associée avec la stimulation de l'expression de la MMP-2.

2-2-2 Augmentation de la sécrétion de proMMP-2

Les cellules cancéreuses du sein, MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri dont le fond était recouvert de Matrigel™ préalablement irradié (5 ou 20Gy). Les milieux conditionnés ont été recueillis 24h plus tard et le niveau protéique de MMP-2 a été déterminé par zymographie (Fig. 10).

Comme contrôle, les cellules cancéreuses du sein ont été ensemencées sur du Matrigel™ non irradié.

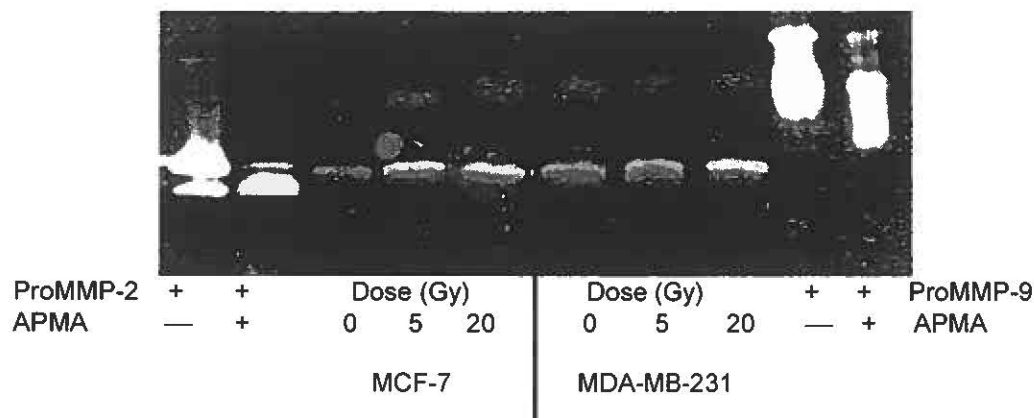


Figure 10. Augmentation de la sécrétion de proMMP-2 des cellules cancéreuses induite par les radiations ionisantes. Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (6×10^5) ont été ensemencées immédiatement après irradiation du Matrigel™ au ^{60}Co aux doses indiquées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été récolté, concentré et analysé pour apprécier la présence de MMP-2 en utilisant un gel de zymographie. Les contrôles proMMP-2 et-9 obtenus de Calbiochem (San Diego, CA) ont été activés avec de l'APMA (1mM) et les formes activée et inactivée ont été ajoutées au gel.

Tel que présenté à la figure 10, l'irradiation du Matrigel™ a augmenté d'environ 5 à 10 fois le niveau de proMMP-2 relâché dans le milieu de culture par les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et MCF-7 à une dose de 20Gy, comparé au contrôle non irradié.

Les milieux conditionnés des 2 lignées cellulaires directement ensemencées sur du plastique ont aussi été analysés par gel de zymographie. En absence de Matrigel™, aucune bande de MMP-2 n'a été observée (données non présentées). Cette donnée supporte l'importance de la présence du Matrigel™ pour induire l'expression de la MMP-2.

2-2-3 Augmentation de l'activité de la MMP-2 lorsque la MB est irradiée

Le niveau d'activation de la MMP-2 à la surface des cellules a été déterminé avec un peptide fluorogénique qui a été ajouté aux cellules cancéreuses du sein après une incubation de 18h sur du Matrigel™ irradié.

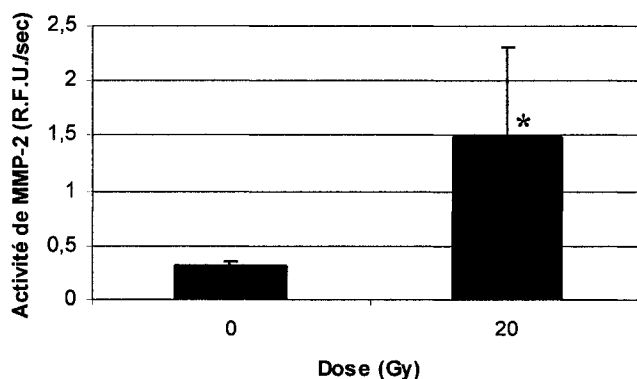


Figure 11. Effet de l'irradiation sur le niveau d'activation de la MMP-2 sur les cellules MDA-MB-231. Le Matrigel™ a été irradié à 20 Gy et les cellules MDA-MB-231 ont été ensemencées 18h à 37°C. Le milieu a été remplacé par du tampon enzymatique et l'activité de la MMP-2 a été mesurée par ajout de peptide fluorogénique Substrat MMP III (* p = 0,0006).

Nos données ont démontré que l'irradiation du Matrigel™ mène à une augmentation de 4,5 fois de l'activité de l'enzyme MMP-2 (Fig. 11) avec les cellules MDA-MB-231. Aucune activation de la MMP-2 n'a été mesurée avec les

cellules MCF-7 (données non présentées), seulement une libération dans le milieu de la forme zymogène a été observée (Fig. 10). Après expériences subséquentes, il a été constaté que l'activité qui était mesurée à la surface des cellules était celle de MT1-MMP et non celle de la MMP-2 (données non présentées).

2-2-4 Régulation de la stimulation de la MMP-2 au niveau de l'expression génique

Une RT-PCR a ensuite été effectuée pour supporter l'hypothèse que l'augmentation du niveau protéique de la MMP-2 était associée avec l'augmentation de l'ARNm correspondant. Comme il est démontré à la figure 12, lorsque les cellules étaient directement ensemencées sur du plastique, le niveau d'expression de la MMP-2 était très faible. En présence de Matrigel™, une augmentation de 1,5 fois du niveau d'ARNm de MMP-2 a été calculée par rapport à celui exprimé sur du plastique. Cette augmentation était encore plus marquée (stimulation d'environ 3 fois) lorsque le Matrigel™ a été irradié (20Gy) avant ensemencement des cellules. Le niveau de l'ARNm de la MMP-2 a été calculé suivant le rapport de quantifications densitométriques des bandes d'intérêts de MMP-2 et de GAPDH, normalisés en fonction de la bande la plus intense de GAPDH. Cependant, ces augmentations ne demeurent toutefois pas significativement différentes.

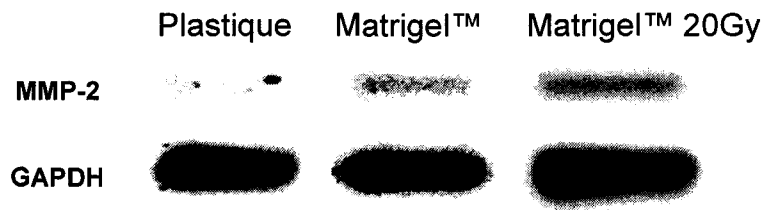


Figure 12. Niveau d'expression de la MMP-2 en fonction du support sur lequel sont ensemencées les cellules MDA-MB-231. Un nombre de 6×10^5 cellules par puits ont été utilisées pour réaliser une RT-PCR semi-quantitative. Expérience réalisée 3 fois.

2-3 Coexpression de la MMP-2, MT1-MMP et de la TIMP-2.

La coexpression de la MMP-2, MT1-MMP et TIMP-2 semble requise pour l'activation du zymogène proMMP-2. Par conséquent, leurs expressions chez les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été déterminées en utilisant la technique RT-PCR semi-quantitative (Fig. 13).

L'expression de la MMP-2 des cellules hautement métastatiques MDA-MB-231 était environ 10 fois supérieure à celle des cellules faiblement métastatiques MCF-7 (Fig. 13 A), tandis que le niveau d'ARNm de MT1-MMP était plus de 1000 fois supérieur dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 13 B). Pour ce qui est de la TIMP-2, la plus grande expression était encore obtenue pour les cellules MDA-MB-231 soit, 15 fois plus que celle exprimée par les cellules MCF-7 (Fig. 13 C).

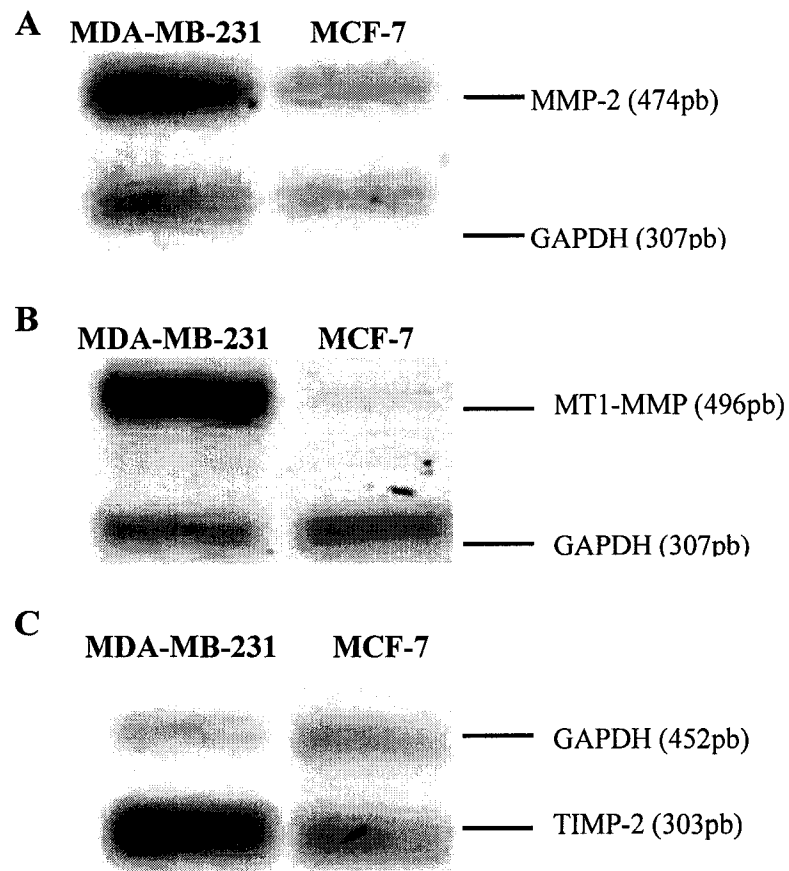


Figure 13. Analyse RT-PCR de la MMP-2, MT1-MMP et TIMP-2 chez les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7 de cancer du sein cultivées en monocouche sur du Matrigel™.

Ces données démontrent une corrélation certaine avec la voie d'activation de la proMMP-2 par le complexe MT1-MMP/TIMP-2 et le haut degré d'invasion observé avec les cellules MDA-MB-231 comparé avec les cellules MCF-7.

2-3-1 Induction de l'expression génique de la MMP-2, MT1-MMP et TIMP-2 par les radiations

Pour supporter l'hypothèse que la radiation n'augmente pas seulement la sécrétion de proMMPs mais aussi l'expression en ARNm de MMPs, une Real-Time PCR a été effectuée pour les gènes MMP-2, MT1-MMP et TIMP-2 chez les cellules MDA-MB-231 (Fig. 14).

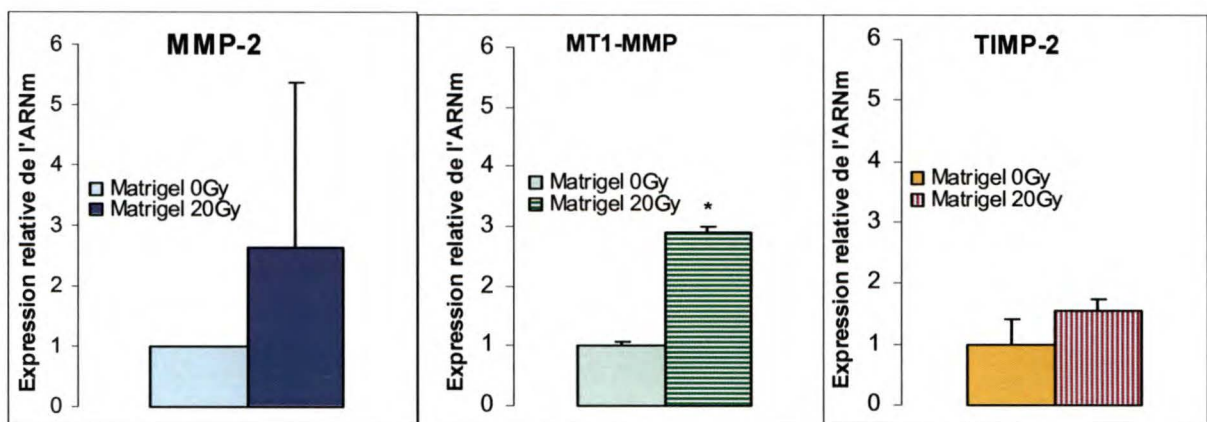


Figure 14. Effet de l'irradiation du Matrigel™ sur le niveau d'expression de la MMP-2, de la MT1-MMP et de la TIMP-2 chez les cellules MDA-MB-231. *p < 0,05. Expériences faites en triplicata.

Comme illustré à la figure 14, une irradiation gamma de 20Gy augmente l'expression de la MMP-2 d'un facteur 2,6 fois et de 2,9 fois pour la MT1-MMP. D'autre part, quasiment aucune variation du niveau de TIMP-2 suite à l'irradiation n'a été mesurée.

2-3-2 Profil d'expression génique des MMPs et TIMPs

Bien que les MMP-2, MT1-MMP et TIMP-2 soient des facteurs importants lors de l'invasion de cellules cancéreuses du sein à travers la MB, d'autres membres de la famille des métalloprotéinases sont aussi suggérés comme pouvant influencer le développement des métastases (BACHMEIER et al., 2001). Dans cette optique, le profil d'expression des ARNm de MMP- 1, -3, -13 et TIMP-1, -3, -4 ont été analysés chez les cellules MDA-MB-231 ,ensemencées sur du Matrigel™ irradié (20Gy) et comparé aux niveaux d'ARNm obtenus en absence d'irradiation par Real-Time PCR (Tab. 7).

Tableau 7. Effet de l'irradiation du Matrigel™, profil d'expressions géniques des MMP-1, -3, -13 et TIMP-1, -3, -4 pour les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.

Gène	Ratio d'expression
MMP-1	0,97 ± 0,33
MMP-3	1,05 ± 0,41
MMP-13	3,00 ± 1,18*
TIMP-1	1,31 ± 0,20
TIMP-3	5,82 ± 3,17
TIMP-4	5,00 ± 1,50*

Ratios normalisés (moyenne ± écart-type) au contrôle Matrigel™ non irradié (Ratio = 1). Expériences faites en triplicata * p < 0,05 est significativement différent.

Cette analyse démontre que l'irradiation du Matrigel™ stimule de 3 à 6 fois l'expression des MMP-13, TIMP-3 et -4 par rapport aux niveaux obtenus lorsque les cellules étaient ensemencées sur du Matrigel™ non irradié. Pour TIMP-3 cette augmentation n'était cependant pas statistiquement significative.

Tableau 8. Effet de l'irradiation du Matrigel™, profil d'expressions géniques des MMP-9, -13 et TIMP-1, -2, -3, -4 pour les cellules cancéreuses du sein MCF-7.

Gène	Ratio d'expression
MMP-2	N.D.
MMP-9	N.D.
MMP-13	0,85 ± 0,11
TIMP-1	1,05 ± 0,06
TIMP-2	1,41 ± 0,17*
TIMP-3	0,99 ± 0,22
TIMP-4	1,02 ± 0,49

Ratios normalisés (moyenne ± écart-type) au contrôle Matrigel™ non irradié (Ratio = 1). N.D. non déterminé. Expériences faites en triplicata * $p < 0,05$ est significativement différent.

Concernant la lignée MCF-7, aucune expression des gènes de MMP-1, -3 et MT1-MMP ont été mesurées. Dans le contexte de notre expérience, il semble y avoir une petite stimulation de l'expression de la TIMP-2 lorsque les cellules MCF-7 sontensemencées sur Matrigel™ irradié à 20Gy. Cette valeur est significativement différente pour un $p < 0,05$ (Tableau 8).

2-3-3 La MT1-MMP, une enzyme clé de l'invasion

Jusqu'à présent, la MMP qui sort du lot des MMPs étudiées est la MT1-MMP, puisque son niveau d'expression génique basal chez la lignée cellulaire MDA-MB-231 (hautement métastatique) est élevé par rapport aux autres MMPs étudiées et que cette même expression est stimulée lorsqu'on irradie le Matrigel™. Notre équipe a alors voulu savoir qu'elle était son importance réelle dans la stimulation de la capacité d'invasion par irradiation du Matrigel™. Une technique de siRNA a donc été mise au point et réalisée pour inhiber

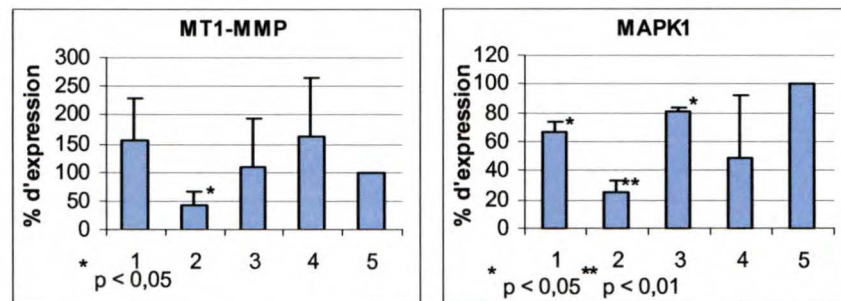
spécifiquement son expression génique (Fig. 15). Cette dernière permet une inhibition non permanente du gène à étudier. Cinq conditions ont été choisies (Fig. 15A). Le volume de siRNA a varié de 0 à 3µl et celui de l'agent de transfection de 0 à 18µl. Ces combinaisons visaient à trouver les conditions idéales pour inhiber efficacement l'expression de la MT1-MMP jusqu'à un maximum d'environ 25% de son niveau initial (sans transfection). Par Real-Time PCR il a été possible de quantifier ces différents niveaux d'expression. Comme contrôle positif, le siRNA de MAPK1 a été choisi (Fig. 15B). Le gène de MAPK1 est ubiquitaire et est hautement exprimé, il constitue un gène clé de la voie de signalisation des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases). Ceci lui permet d'être une cible idéale pour un contrôle positif de siRNA. La compagnie QIAGEN a testé la fonction de ce siRNA par real-time RT-PCR et ce dernier a montré plus de 70% de répression du gène cible. Mais pour cela, il faut également trouver les bonnes conditions (combinaison des volumes de HiPerfect et siRNA de MAPK1) qui conviennent à nos cellules MDA-MB-231 en terme de toxicité et d'efficacité du siRNA.

La toxicité des siRNA utilisés sur les cellules MDA-MB-231 a été vérifiée seulement par observation morphologique des cellules (données non présentées).

A.

Essai #	siRNA (µl)	HiPerfect (µl)
1	0,6	6,0
2	0,6	18,0
3	1,2	3,0
4	3	3,0
5	0	0,0

B.



C.

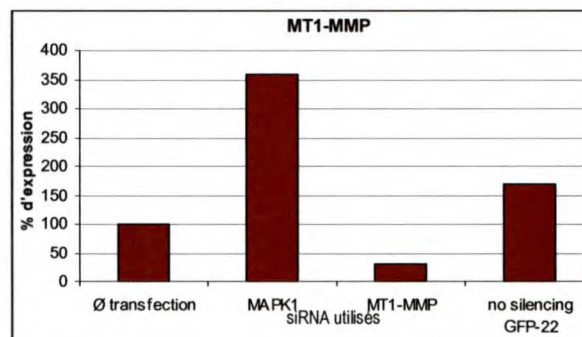


Figure 15. siRNA de MT1-MMP et MAPK1. Mise au point des siRNA de MT1-MMP et MAPK1 pour avoir une inhibition maximale de l'expression des gènes étudiés. **A.** Cinq combinaisons de volumes de siRNA et de réactif de transfection utilisés. **B.** % d'expression des niveaux d'ARNm de MT1-MMP et MAPK1 mesurés par Real-Time PCR, suite aux différents traitements appliqués. Les cellules étaient ensemencées sur du plastique. L'évaluation de ce % a été calculé en fonction de la condition #5 : aucun siRNA transfecté **C.** Real-Time PCR de la MT1-MMP. Contrôles négatifs : sans siRNA (100% d'expression) et GFP-22 « no silencing »; contrôle positif MAPK1. La condition d'expérience #2 a été appliquée.

Un fois traitées avec les différents siRNA, les cellules MDA-MB-231 ont été placées dans des chambres d'invasion et leur capacité d'invasion cellulaire a été mesurée par le nombre de cellules traversant la membrane. Les résultats ont été comptabilisés au tableau 9.

Tableau 9. Effet de l'irradiation sur l'invasion des cellules MDA-MB-231 lorsque l'expression de la MT1-MMP est inhibée par siARN.

Conditions	MOYENNE	E.T.
0Gy	421	80
20Gy	1095	266
20Gy + siRNA MT1-MMP	616	55
20Gy + siRNA MAPK1	953	108
20Gy + siRNA no silencing GFP-22	369	125

Les cellules ont été préalablement traitées soit par le siRNA MAPK1 (Contrôle positif), soit par le siRNA GFP-22 (contrôle négatif) et soit par le siRNA MT1-MMP pendant 48h. Puis, elles ont été transférées dans les chambres d'invasion irradiées à 0 ou 20Gy (1×10^4 cellules/puits) pour incubation pendant 24h. Moyenne comptabilisée du nombre de cellules ayant traversé la membrane (moyenne \pm écart-type).

Comme il a été précédemment démontré, l'irradiation du Matrigel™ augmente la capacité d'invasion des cellules cancéreuses MDA-MB-231. Ici, le nombre de cellule ayant traversé la membrane a plus que doublé. Si les cellules sont traitées avec le siRNA de la MT1-MMP, cette invasion chute presque de moitié. Inversement, aucun effet n'a été mesuré avec le siARN MAPK1. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression de la MT1-MMP inhibe l'augmentation de l'invasion induite par les radiations. Concernant le siARN no silencing GFP 22, cette transfection a diminué de près de 3 fois de nombre de cellules MDA-MB-231 qui ont traversées le Matrigel irradié, bien que l'essai de Real Time PCR rapportait aucune inhibition de l'expression de la MT1-MMP.

Cette diminution pourrait certainement refléter un effet non spécifique ou toxique du siARN no silencing GFP 22. Cet aspect du projet devra être étudié plus en profondeur.

3- Effet de la 4-OHE₂

La 4-OHE₂ est un composé de la famille des catécholestrogènes capable de générer des radicaux libres, comme précédemment établi par l'équipe de Paquette (PAQUETTE et al., 2004).

3-1 La 4-OHE₂ a le potentiel d'augmenter l'invasion des cellules MDA-MB-231

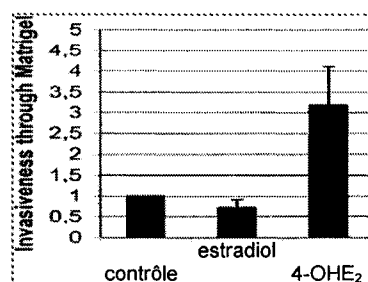


Figure 16. Effet de la 4-OHE₂ sur l'invasion de cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 (4×10^4) ont été traitées avec des estrogènes à 10^{-8} M pendant 6 h dans du milieu de culture MEM supplémenté avec 0,1% BSA ($n = 3-6$). Estradiol vs. contrôle, $p = 0,04$; 4-OHE₂ vs. contrôle, $p = 0,03$.

Les données obtenues avec les chambres d'invasion pour les cellules MDA-MB-231 traitées pendant 6h avec l'estradiol ou la 4-OHE₂ à 10⁻⁸M (Fig. 16), ont démontré que la 4-OHE₂ augmentait de façon significative ($p = 0,04$) de plus de 3 fois l'invasion de ces cellules. Tandis que l'estradiol avait tendance à légèrement diminuer l'invasion de ces dernières ($p = 0,03$). Les résultats ont été normalisés en fonction de cellules contrôles qui n'ont subi aucun traitement hormonal. D'autre part, l'estradiol ne possédant pas la structure catéchol ne peut pas produire de radicaux libres et n'augmente donc pas l'invasion des cellules MDA-MB-231. Le développement des métastases étant étroitement relié à l'activation de certaines proMMPs, l'équipe du Dr Paquette a déjà clairement démontré que la proMMP-2 peut être activé par la 4-OHE₂ à une concentration de 10⁻⁸M (PAQUETTE et al., 2004).

3-2 La 4-OHE₂ augmente la sécrétion de la proMMP-2 et l'active chez les cellules MDA-MB-231

La capacité de la 4-OHE₂ d'augmenter la sécrétion de la proMMP-2 a été déterminée en analysant par zymographie le milieu conditionné obtenu suite à l'incubation des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 avec la 4-OHE₂ 10⁻⁵M et comparé avec le PMA. Le PMA, reconnu pour stimuler l'expression de la proMMP-2, a été ajouté aux cellules et utilisé comme contrôle positif. Des cellules qui n'ont eu aucun traitement constituaient le contrôle négatif. La proMMP-2 commerciale a été incubée avec ou sans APMA, un activateur de proMMP-2 et

ajouté au gel de zymographie afin de distinguer le zymogène de sa forme active (Fig.17).

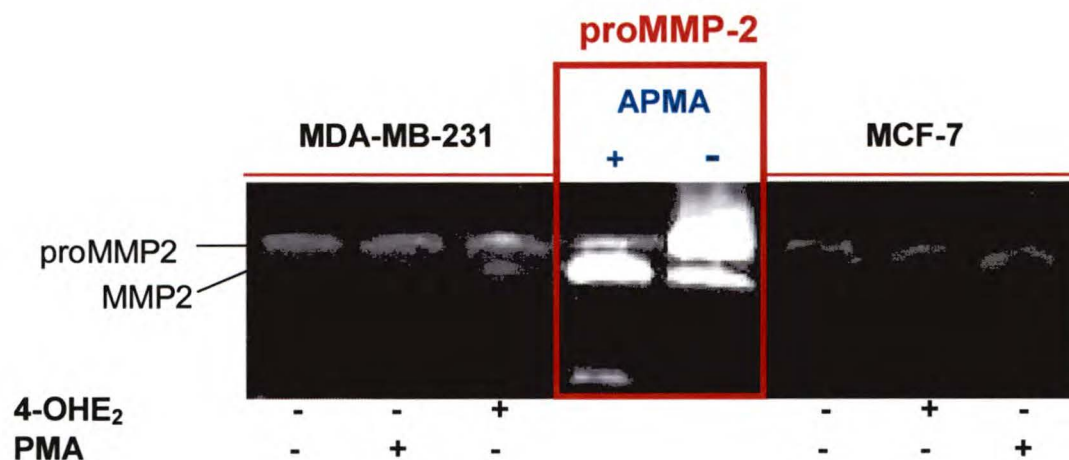


Figure 17. Effet de la 4-OHE₂ sur la sécrétion de la proMMP-2 chez les lignées cellulaires cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7. 6 x 10⁵ cellules ont étéensemencées sur du Matrigel™ puis traitées avec ou sans avec la 4-OHE₂ 10⁻⁵M ou encore la PMA à 10μM. Les milieux conditionnés ont été récoltés, concentrés et analysés par gel de zymogramme. Le contrôle proMMP-2 a été activé avec de l'APMA à 1mM afin de distinguer les formes activée et inactivée.

Cette analyse permet d'observer deux phénomènes pour les cellules MDA-MB-231 traitées avec la 4-OHE₂. Premièrement, une faible augmentation de la sécrétion de la proMMP-2, et deuxièmement une activation de l'enzyme en MMP-2. Cette conversion pourrait être induite soit par la 4-OHE₂ comme précédemment démontré dans le laboratoire du Dr Paquette, soit par la MT1-MMP qui est fortement exprimée chez les cellules MDA-MB-231 (Fig. 13B). Concernant les cellules MCF-7, aucun changement dans le niveau de sécrétion de proMMP-2 ou d'activation en MMP-2 ont été observé.

3-3 La 4-OHE₂ augmente l'expression de certains gènes

Un profil d'expression des MMPs et TIMPs a aussi été réalisé par Real-Time PCR lorsque les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec la 4-OHE₂ (Tab. 10). Le niveau d'expression de la MT1-MMP était fortement augmenté (d'un facteur 5) lorsque les cellules étaient traitées avec ce métabolite de l'estradiol. Le mécanisme d'induction de l'expression de la MT1-MMP est donc stimulé. Même si tous les niveaux d'expression des TIMPs ont été augmentés de façon significative, excepté pour la TIMP-2, ils ne l'ont pas été autant que celui de la MT1-MMP.

Tableau 10. Effet de la 4-OHE₂ sur le profil d'expression des MMP-1, -2, -3, -9, -13, MT1-MMP et TIMP-1, -2, -3, -4 pour les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et MCF-7.

Nom du gène	MDA-MB-231	MCF-7
	Ratio 4-OHE ₂ /contrôle	
MMP-1	1,17 ± 0,16	-
MMP-2	1,16 ± 0,75	N.D.
MMP-3	2,08 ± 0,81	-
MMP-9	N.D.	2,46 ± 0,82
MMP-13	0,92 ± 0,04	0,74 ± 0,08*
MT1-MMP	4,80 ± 1,35*	-
TIMP-1	1,56 ± 0,08**	0,91 ± 0,08
TIMP-2	1,73 ± 0,42	1,77 ± 0,31*
TIMP-3	2,58 ± 0,50*	2,60 ± 1,04
TIMP-4	2,50 ± 0,50*	1,85 ± 0,18

Ratios normalisés (moyenne ± écart-type) au contrôle Matrigel™ non irradié (Ratio = 1). N.D. non déterminé, - non détectable. Expériences réalisées en triplicata * p < 0,05 et ** p < 0,005.

Pour la lignée MCF-7, les variations d'expression des gènes étudiés n'étaient pas significatif, sauf pour MMP-13 où il y a eu une diminution significative de son expression et pour TIMP-2 où il y a eu une augmentation de son expression.

4- Effet combiné de la radiation gamma et de la 4-OHE₂

4-1 Profils d'expression des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7

Les niveaux d'ARNm de MMP-1, -2, -3, -9, -13, MT1-MMP et TIMP-1, -2, -3, -4 ont alors été analysées par Real-Time PCR pour les deux lignées cellulaires étudiées (Tab. 11). Le Matrigel™ a été irradié à une dose de 0 ou 20Gy puis les cellules ont étéensemencées et incubées en présence ou en absence de 4-OHE₂ 1×10^{-8} M. Les niveaux d'expression d'ARNm chez les cellulesensemencées sur du Matrigel™ non irradié ont servis de niveaux basal pour calculer les ratios.

Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de la MMP-13 d'un facteur 3 en combinant radiation du Matrigel™ et incubation avec la 4-OHE₂. L'expression de la MT1-MMP a aussi augmenté mais de façon plus importante, soit de 5 fois comparativement au contrôle non traité. L'expression des TIMP-3 et -4 ont aussi été stimulées d'un facteur 2 (Tab. 11).

Tableau 11. L'effet combiné des 2 traitements des cellules de MDA-MB-231 et celle de MCF-7 pour les gènes de MMP-1, -2, -3, -9, -13, MT1-MMP, TIMP-1, -2, -3 et -4.

	MDA-MB-231	MCF-7
Nom du gène	Ratio γ + 4-OHE ₂	
MMP-1	0,99 \pm 0,17	-
MMP-2	4,71 \pm 4,55	N.D.
MMP-3	0,81 \pm 0,22	-
MMP-9	N.D.	4,49 \pm 1,59***
MMP-13	2,58 \pm 0,13*	1,08 \pm 0,33
MT1-MMP	5,12 \pm 0,88*	-
TIMP-1	1,58 \pm 0,06*	0,96 \pm 0,11
TIMP-2	1,15 \pm 0,18	2,09 \pm 0,58
TIMP-3	2,90 \pm 1,05**	1,29 \pm 0,53
TIMP-4	1,83 \pm 0,29*	1,21 \pm 0,15*

Ratios normalisés (moyenne \pm écart-type) au contrôle Matrigel™ non irradié (Ratio = 1). N.D. non déterminé, - non détectable. Expériences réalisées en triplicata * p < 0,05, ** p < 0,005 et *** p < 0,0005

Pour la lignée cellulaire MCF-7, la combinaison irradiation du Matrigel™ et incubation des cellules avec la 4-OHE₂ entraînait une forte augmentation très significative (p < 0,0005) de 4,5 fois pour le gène MMP-9. Le gène TIMP-4 a aussi été significativement augmenté (p < 0,05) de 1,2 fois. L'expression de TIMP-2 a doublé, mais ce résultat n'était pas significatif ; tandis que les expressions de MMP-13, TIMP-1 et -3 ont été inchangées par rapport au contrôle non traité.

DISCUSSION

Cinq à dix ans après le traitement d'une tumeur primaire du sein par chirurgie et radiothérapie, une récurrence du cancer au même endroit de façon loco-régionale ou à distance, sous forme de métastases, peut être observée (CLEMONS et al., 2003; FORD et al., 2005). Les effets bénéfiques de la radiothérapie sont bien connus puisque l'omission de ce traitement diminue significativement le taux de guérison. Le but de la première section de ce projet de recherche était de déterminer si les radicaux libres générés par les radiations ionisantes pouvaient stimuler la capacité d'invasion de cellules cancéreuses du sein.

Cette problématique suscite de plus en plus d'intérêts dans les communautés clinique et scientifique. Déjà dès 1949, une étude d'envergure sur ce sujet a été réalisée par Kaplan et Murphy (KAPLAN et MURPHY, 1949). Selon ces chercheurs, deux phénomènes semblent être impliqués. Premièrement, l'augmentation du nombre de métastases à la suite de l'irradiation d'une tumeur. Deuxièmement, la localisation des métastases dans les tissus normaux préalablement irradiés. En se basant sur ces observations, le premier objectif de notre étude était de déterminer comment l'irradiation de la MB pourrait être

impliquée dans l'augmentation de la capacité métastatique de cellules cancéreuses.

Notre étude visait également à étudier l'effet d'un deuxième stress oxydatif occasionné par la génération de radicaux libres provenant des hydroxyestrogènes présents en grande quantité dans les tumeurs du cancer du sein. En effet, les tissus mammaires ont la capacité de métaboliser l'estrogène (ABUL-HAJJ et CISEK, 1988; LIEHR et RICCI, 1996). L'aromatase est considérée comme un pivot important du métabolisme de l'estrogène parce qu'elle est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de ce métabolisme et qu'elle est produite à la fois par les cellules adipeuses et épithéliales formant la tumeur mammaire. Or, chez la femme atteinte d'un cancer du sein, le métabolisme de l'estrogène est altéré (ROGAN et al., 2003). Il s'en suit une accumulation des métabolites hydroxyestrogènes (REED et al., 1989). Notre étude a donc spécifiquement porté sur le rôle d'un stress oxydatif induit par la 4-OHE₂ dans l'augmentation de la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein. Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour réaliser cette étude. Elles ont été choisies suivant des critères précis. Elles proviennent d'adénocarcinomes mammaires humains. La lignée cellulaire MDA-MB-231 est très invasive parce qu'elle exprime beaucoup de MMPs et ne possède pas de récepteurs à estrogène. Tandis que la lignée cellulaire MCF-7 est très peu invasive, elle exprime moins de MMPs et possède des récepteurs à estrogène (BACHMEIER et al., 2001; BALDUYCK et al., 2000; ROGAN et al., 2003). Le caractère mitotique de l'estrogène n'entre pas en ligne de compte puisque les hydroxyestrogènes sont faiblement estrogéniques

comparativement à l'estradiol et que les cellules MDA-MB-231 qui démontrent la plus forte activation de leur capacité d'invasion par la 4-OHE₂ n'expriment pas les récepteurs d'estrogènes (CLEMONS et GOSS, 2001). Donc cela signifie que la 4-OHE₂ n'augmente pas la croissance des cellules MDA-MB-231 en terme de prolifération et de différenciation. Son rôle est encore nébuleux. Mais notre équipe a toutefois démontré qu'elle favorise la production de radicaux libres. Il est soupçonné l'implication d'une ou de plusieurs voies d'activations induisant des modifications plus conséquentes sur la capacité d'invasion des cellules MDA-MB-231.

Les cellules sont liées entre elles et à la MB par des systèmes de jonction et par des molécules d'adhésion (NAWROSKI RABY et al., 2001). La MB influence le comportement des cellules via des récepteurs de facteurs de croissance et des intégrines qui modifient la croissance cellulaire en terme de prolifération, de différenciation, de synthèse de protéines et de mobilité (KUMAR, 1997). Ainsi, la cellule est en constante interaction avec son environnement. Tout changement est donc détecté et induit une réponse chez la cellule.

Nos résultats obtenus à partir de chambres d'invasion ont démontré que la capacité d'invasion des cellules hautement métastatiques MDA-MB-231 était dose dépendante de l'irradiation du Matrigel™. Le pourcentage d'invasion a été augmenté pour cette lignée cellulaire pour une dose d'irradiation aussi faible que 2 Gy jusqu'à 125% pour être maximale à une dose de 10Gy à un peu plus de 250%. Cette stimulation de la capacité d'invasion était aussi reliée à la

concentration en cellules ensemencées. Suite à une irradiation du Matrigel™ avec 5 Gy, l'augmentation de l'invasion des cellules MDA-MB-231 était 4 fois plus importante à une densité d'ensemencement de 4×10^4 cellules par 0.5 ml MEM comparativement à 1×10^4 . Inversement pour la lignée cellulaire MCF-7 faiblement métastatique, aucune augmentation de l'invasion suite à l'irradiation du Matrigel™ a été observée. Ce résultat a été associé au très faible niveau d'expression de la MT1-MMP chez les cellules MCF-7 comparativement aux cellules MDA-MB-231. En effet, lorsqu'il y a un plus grand nombre de cellules, on assiste à une plus grande concentration des MMPs et entre autre de MT1-MMP. Il est donc normal que le nombre de cellules MDA-MB-231 qui a traversé le Matrigel™ irradié soit plus élevé.

Pour expliquer l'augmentation de la capacité d'invasion suite à l'irradiation du Matrigel™, plusieurs mécanismes ont été envisagés. L'augmentation de l'invasion observée avec les cellules MDA-MB-231 serait due à la présence de radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau. Les radiations ionisantes du type rayons gamma produisent des radicaux libres en interagissant avec l'eau. L'espèce réactive de l'oxygène principalement produite est le radical hydroxyle (SPINKS et WOODS, 1990). Ces radicaux libres sont reconnus pour activer certaines proMMPs (SHAUGHNESSY et al. 1993). Dans une précédente étude, notre équipe a démontré que les radiations gamma n'activaient pas les proMMP-2 et -9, même à des doses aussi élevées que 100Gy. Puisque les radiations gamma ne les activent pas, nous nous sommes questionnés sur les voies

d'activation indirectes de ces radiations sur les cellules cancéreuses produisant ces MMPs.

De plus, la présente étude démontre que la sécrétion de proMMP-2 augmente selon la dose d'irradiation de 5 à 10 fois pour les 2 lignées cellulaires étudiées, mais aucune MMP-2 active relâchée dans le milieu n'a été détectée par zymographie, même à 20Gy. Cependant, en quantifiant l'activité de la MMP-2 à la surface de ces cellules, nos résultats démontrent qu'une irradiation du Matrigel™ stimule son activité. Il faut toutefois préciser que le peptide fluorogénique utilisé pour évaluer cette activité n'est pas exclusivement spécifique à la MMP-2. Il peut s'associer à la MMP-9 et la MT1-MMP. Suite à d'autres expériences, on s'est rendu compte que l'activité qui a été quantifié était celle de la MT1-MMP et non celle de la MMP-2 (données non présentée).

Nous avons alors vérifié si l'augmentation de la sécrétion de la proMMP-2 suite à l'irradiation gamma du Matrigel™ était corrélée avec l'augmentation de son ARNm. Une Real-Time PCR pour les cellules MDA-MB-231 qui ont étéensemencées sur du Matrigel™ irradié et non irradié a été réalisée. Une augmentation de près de 3 fois du niveau d'ARNm de la MMP-2 a été constatée lorsque le Matrigel™ a été irradié à 20Gy par rapport au niveau d'ARNm des cellulesensemencées sur du Matrigel™ non irradié. Ces derniers résultats confirment que l'augmentation de l'expression génique de la MMP-2 s'accompagne bien d'une augmentation du relâchement de la proMMP-2 dans l'environnement cellulaire. Ainsi, l'ensemble des résultats collectés et analysés

démontrent que les rayons gamma ne permettent pas la conversion de la forme zymogène de la MMP-2 en sa forme mature mais augmentent l'expression de leur ARN messagers.

Une autre hypothèse expliquant l'augmentation de l'invasion des cellules MDA-MB-231 énonce que la MB emmagasine de nombreux facteurs de croissance (SEGHAL et THOMPSON, 1999) (TGF β 1, EGF, IGF I et II et HGF) qui peuvent être relâchés suite à un stress. Des études ont démontré que ces facteurs de croissance stimulaient et augmentaient l'expression et même l'activité de MMP-2 et MT1-MMP dans le cas de lignées cellulaires de carcinomes squameux de la cavité buccale (MUNSHI et al., 2004) et de MMP-2 et MMP-9 dans quelques lignées cellulaires humaines cancéreuses du poumon (BREDIN et al., 2003). Nos résultats suggèrent que le Matrigel™ endommagé par les radiations ionisantes pourrait libérer ces facteurs d'invasion. Selon le manufacturier, le Matrigel™ contiendrait approximativement, 0,5-1,3 ng/ml de EGF, 0,1-0,2 pg/ml de bFGF, 0,2 ng/ml de NGF, 5-48 pg/ml de PDGF, 11-24 ng/ml d'IGF-1 et 1,7-4,7 ng/ml de TGF- β .

Ces facteurs activeraient des voies de signalisation via leurs récepteurs et des intégrines, tel que l'intégrine $\alpha\beta$ 3. Ces dernières participeraient à induire l'invasion des cellules via des mécanismes encore peu connus (HORNEBECK et al., 2002). Des tests de chambre d'invasion ont été réalisés dans notre laboratoire pour appuyer cette hypothèse. Lorsque le Matrigel™ recouvert de PBS a été irradié à 20Gy et que ce PBS a été transféré dans une nouvelle

chambre non irradiée. Les cellules qui ont ensuite été ensemencées ont acquis une plus grande capacité d'invasion. Pour ces conditions, le nombre de cellules MDA-MB-231 qui a traversé la membrane s'élève en moyenne à $57,0 \pm 28,6$. Ce nombre est quasiment égal à celui dénombré lorsque les cellules ont été ensemencées sur du Matrigel™ recouvert de PBS et irradié ($54,0 \pm 13,0$). Dans cette étude, nous avons démontré que le Matrigel™ irradié libérait une faible quantité de MMP-2. Une étude subséquente devra être effectuée afin de déterminer si d'autres facteurs sont aussi libérés.

Ces mêmes facteurs agiraient également sur l'expression génique de la MMP-2, comme le suggèrent aussi les résultats obtenus par RT-PCR et Real-Time PCR. Les analyses d'expression des MMPs effectuées par les autres laboratoires ont été réalisées qu'avec des cellules ensemencées sur du plastique. Notre équipe a effectué cette étude avec des cellules ensemencées sur du Matrigel™ afin de se rapprocher de l'environnement normal physiologique. Le système Matrigel™ - cellules cancéreuses ajoute donc un niveau de complexité en se rapprochant ainsi un peu plus des conditions généralement observées pour une tumeur et son environnement. Dans la présente étude, l'analyse de l'expression des MMPs et des TIMPs par Real-Time PCR, pour les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7, a présenté des profils d'expression différents de ceux proposés dans la littérature (BALDUYCK et al., 2000; BARTSCH et al., 2003; GIAMBERNARDI et al., 1998; KOUSIDOU et al., 2004) à cause justement de l'utilisation de la MB artificielle Matrigel™.

D'autre part, nos résultats se rapprochent de ceux publiés par l'équipe de TAKINO et al., 2004 qui ont démontré que les niveaux d'ARNm de la MMP-2, MT1-MMP, MMP-13 et TIMP-2 augmentaient lorsque les cellules étaient ensemencées sur une matrice riche en collagène (TAKINO et al., 2004). Le Matrigel que nous avons utilisé était pour sa part composé de 56% laminine, 31% collagène de type IV et 8% entactine (BD BIOSCIENCES, 2005). Ainsi, lors de notre étude, lorsque le Matrigel™ est irradié à 20Gy, les niveaux d'expression génique de la MMP-2, MMP-13, MT1-MMP et TIMP-2 ont augmentés de près de 3 fois pour les trois MMPs et de presque 2 fois pour la TIMP-2. Fait intéressant, les niveaux d'expression des TIMP-3 et -4 ont également augmentés, 6 et 5 fois. Il y a une certaine régulation de l'homéostasie, mais le déséquilibre MMPs - TIMPs est si grand que la balance penche en faveur des MMPs pour induire l'invasion. Il est à noter le rôle bivalent de la TIMP-2. Il est à la fois inhibiteur et activateur, tout dépendant de sa concentration protéique. Des études ont démontré que si la concentration de TIMP-2 est trop faible, l'activation efficace de la MMP-2 ne peut se produire. Au contraire, si cette concentration est élevée, toutes les proMMP-2 sécrétées sont neutralisées par la TIMP-2 et ainsi inhibées. Dans ce cas aucune activation de proMMP-2 n'aura lieu (Li et al., 2005).

L'invasion des cellules est caractérisée par la production et la sécrétion des protéases telles que les MMPs pour dégrader la MB. Les cellules MCF-7 n'expriment pas la MT1-MMP, résultat confirmé par les études de BARTSCH et al., 2003 ainsi que RATNIKOV et al., 2002. Cette expression est aussi non inductible pour cette lignée cellulaire et elle exprime la TIMP-2 et la MMP-2 en

proportion plus faible par rapport aux cellules MDA-MB-231, comme nos résultats l'ont démontré par RT-PCR. Même s'il a été constaté pour les deux lignées cellulaires une augmentation dose dépendante après irradiation du Matrigel™ de la sécrétion de proMMP-2, le complexe MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2 ne pouvait pas se former à la surface membranaire des cellules MCF-7 ce qui pourrait expliquer pourquoi l'irradiation du Matrigel n'a pas entraîné d'augmentation de leur capacité d'invasion.

Nos résultats ont aussi démontrés qu'effectivement la MT1-MMP participe activement à augmenter la capacité d'invasion des cellules MDA-MB-231. En effet, en inhibant d'environ 75% l'expression de la MT1-MMP comparativement à son niveau initial par siRNA, une forte diminution de l'activation de la capacité d'invasion par l'irradiation du Matrigel a été observée par les chambres d'invasion.

Pour ce qui est de la MMP-13, notre équipe a observé que l'ARNm de cette dernière est fortement stimulé lorsque le Matrigel™ est irradié à 20Gy. Son niveau génique a triplé en comparaison à son expression lorsque le Matrigel™ n'est pas irradié. Cette MMP-13 jouerait aussi un rôle crucial dans l'invasion de tumeurs malignes de carcinomes vulvaires à cause de sa spécificité exceptionnelle à une large gamme de substrats à comparer aux autres MMPs (JOHANSSON et al., 1999 ; YANA et SEIKI, 2002). En effet, la MMP-13 possède une grande activité qui est de 40 fois supérieure à celle des gélatinases. Elle clive les collagènes fibrillaires (de type I, II, IV, IX, X, XIV et surtout de type II). Elle

dégrade également la ténascine, la fibronectine et le cœur de la protéine aggrécane. De plus, la MMP-13 est coexprimée avec la MT1-MMP et est activée par la MMP-2 (JOHANSSON et al., 1999 ; YANA et SEIKI, 2002). Son rôle dans le développement des métastases du sein reste cependant à être déterminé. Toutefois, elle agirait en combinaison avec la MT1-MMP.

Les MMPs peuvent influencer de façon indirecte l'environnement immédiat de la tumeur en relâchant des facteurs de croissance ou pro-angiogéniques emprisonnés dans la MB et rendant accessibles des sites cryptiques (STETLER-STEVENSON et ANITA, 2001). Des fragments de MB et des sites cryptiques découverts à la suite de l'action des protéinases peuvent augmenter l'expression des MMPs (KOSHIKAWA et al., 2000; SCHENK et al., 2003). Ces fragments et ces sites participeraient aussi à augmenter l'invasion des cellules MDA-MB-231. Peu de choses pour l'instant ont été découvertes sur ces mécanismes. Mais il a été observé que lorsque le collagène est dénaturé, ses sites cryptiques alors exposés sont reconnus par l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (HORNEBECK et al., 2002). Un mécanisme similaire de fragmentation des constituants de la MB par les radiations pourrait aussi expliquer l'augmentation de l'expression de certaines MMPs et TIMPs chez les cellules cancéreuses ensemencées sur du Matrigel™ irradié.

Ces différents acteurs qui entrent en jeu ont certainement contribué à augmenter le potentiel d'invasion des cellules MDA-MB-231. Les cellules de la lignée cellulaire MCF-7 répondaient aussi en partie à ces types de voies de

signalisations mais leur capacité d'invasion n'a pas été augmentée à cause de l'absence d'expression de la MT1-MMP.

L'autre partie de l'étude a démontré que le traitement des cellules cancéreuses MDA-MB-231 ensemencées sur du Matrigel™ et traitées avec la 4-OHE₂ dont la concentration est aussi faible que 10nM induit une augmentation de la sécrétion de la proMMP-2. La 4-OHE₂ est le métabolite de l'estradiol qui génère le plus de radicaux libres (Paquette et al., 2003). Ces radicaux présents dans l'environnement de ces cellules activeraient les proMMPs, en particulier la proMMP-2, sécrétée par ces dernières. Nos résultats de zymographie ont montré une faible augmentation de MMP-2 dans le milieu. Les ERO générés par la présence de la 4-OHE₂ serait peut-être à l'origine de cette augmentation. Mais, ce ne serait pas le cas puisque lorsqu'on traite dans les mêmes conditions, les cellules MCF-7 et aucune MMP-2 active n'est observée par zymographie. Ces résultats montrent alors le rôle indispensable et crucial de la MT1-MMP. En effet, la seule interprétation plausible à apporter est la capacité de la lignée cellulaire MDA-MB-231 à produire la MT1-MMP qui activerait efficacement la proMMP-2.

De plus, nos résultats sur l'augmentation de l'expression de certaines MMPs et TIMPs suggèrent une implication de ce métabolite 4-OHE₂ dans des voies de signalisation différentes que celles passant par son association avec son récepteur d'estrogène puisque ceux-ci sont absents chez les cellules MDA-MB-231.

Une corrélation entre l'expression de la MT1-MMP et la MAPK1 a été démontré (SATO et al., 2005; TAKINO et al., 2004). La protéine encodée par ce gène est un membre de la famille des MAP Kinases, connue aussi sous le nom de signal extracellulaire régulée par les kinases (ERK). Elle agit comme point d'intégration pour multiples signaux biochimiques et est impliquée entre autre dans la régulation de la transcription de gène. Lorsque la MAPK1 est activée par phosphorylation, elle se transloque au noyau pour stimuler la cellule en phosphorylant des cibles nucléaires (GENE DATABASE, 2005). Lorsque l'expression de la MT1-MMP est stimulée, une stimulation de MAPK1 peut aussi être observée. Cela, nos résultats obtenus des siRNA l'ont montrés. ERK est activée dans les cellules cultivées sur du collagène via leurs interactions avec les intégrines (TAKINO et al. 2004). Une fois activée, ERK stimule l'expression de MT1-MMP, MT1-MMP induit, exerce un rétrocontrôle positif sur ERK. Ce mécanisme permet l'accumulation de la MT1-MMP et ultimement la migration des cellules. L'implication de la 4-OHE₂ dans cette voie d'activation n'a pas encore été étudiée. Cependant, nous avons constaté que l'expression de MT1-MMP est amplifiée par la 4-OHE₂, donc il est possible de présupposer que ce promoteur existe belle et bien.

Notre équipe a voulu observer si la combinaison des deux traitements, irradiation du Matrigel™ et traitement des cellules avec la 4-OHE₂ avait un effet synergique sur l'expression génique de certaines MMPs et TIMPs chez les cellules à l'étude. Il est à noter que le niveau d'expression de la MMP-2 chez la lignée cellulaire MDA-MB-231 a augmenté de 5 fois. Mais malheureusement ce

résultat n'est pas significatif, il faudrait faire d'autres essais de Real-Time PCR pour confirmer ces résultats. Dans ce même cas de figure, pour la même lignée cellulaire, le niveau d'expression génique de la MT1-MMP est augmenté de 5 fois, au même niveau que celui observé lorsque les cellules sont traitées avec la 4-OHE₂. Il n'y a donc pas d'effet synergique même si lorsque le Matrigel™ est irradié le niveau d'expression de la MT1-MMP est augmenté de 3 fois. Par contre, pour la MMP-13, il est possible de dire que des deux traitements appliqués, la part de l'irradiation du Matrigel™ est cruciale. Son niveau d'expression des suite du traitement combiné (augmentation de 3 fois) égale celui du traitement unique administré au Matrigel™. Le niveau d'expression de la TIMP-2 a augmenté au même niveau peu importe le traitement appliqué.

Pour la lignée cellulaire MCF-7, une augmentation du niveau d'expression de la MMP-9 de plus de 5 fois a été mesurée suite à l'application de la combinaison des traitements. Malheureusement, nous ne pouvions formellement conclure sur l'accomplissement d'un effet synergique. En effet, le niveau d'expression de ce gène n'a pu être déterminé lorsque le Matrigel™ a été irradié. Par contre son niveau d'expression après traitement des cellules à la 4-OHE₂ induisait une augmentation de 2,5 fois (résultat non significatif). La 4-OHE₂ semble avoir un effet sur l'expression de la MMP-9. Des essais de Real Time PCR devront être répétés, ceux-ci pourraient être appuyés par une zymographie.

CONCLUSION

L'invasion des cellules cancéreuses est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs acteurs. Lors de notre étude sur la capacité d'invasion des cellules cancéreuses du sein en présence de stress oxydatif, deux axes ont été explorés. L'effet des rayons gamma sur le Matrigel™ et l'exposition de cellules cancéreuses du sein au 4-OHE₂.

Les rayons gamma augmentent l'invasion des cellules cancéreuses du sein seulement chez celles qui exprime la MT1-MMP. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs mécanismes sont possibles. En plus de la régulation par les interactions MMP-TIMP, de nouvelles évidences indiquent que la régulation se fait à plusieurs niveaux : par l'interaction de protéines d'attachement à la MB par des voies de signalisation pour induire la transcription, par la modulation de la sécrétion. Celles-ci jouent un rôle important dans la biologie des MMPs.

De plus, la capacité de la 4-OHE₂ à augmenter l'invasion semble reliée à sa capacité de stimuler l'expression de la MT1-MMP. Ainsi la MT1-MMP devient une cible de choix contre l'invasion de ces cellules. Cette protéine pivot semble être régulée par les modifications de structures apportées à la MB soit des suites d'une irradiation, soit par une dégradation causée par une attaque des MMPs. La

MMP-13 ferait également une bonne cible, mais uniquement dans des situations où des facteurs de croissance seraient présents dans l'environnement immédiat.

En approfondissant nos connaissances sur le comportement des cellules cancéreuses du sein en situation de stress oxydatif et en observant leur capacité d'adaptation vis-à-vis de leur environnement, il sera possible de mieux nous armer contre le problème de la récurrence du cancer du sein.

BIBLIOGRAPHIE

Abul-Hajj, Y.J., and P.L. Cisek. 1988. Catechol estrogen adducts. *J Steroid Biochem.* 31:107-10.

Ayres, S., M., Tang, and M.T., Subbiah. 1996. Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med.* 128(4):367-75.

Awwad, H.K., Y., Khafagy, M., Barsoum, S., Ezzat, I., el-Attar, H., Farag H., Akoush, Meabid H., and M.S., Zaghloul. 1992. Accelerated versus conventional fractionation in the postoperative irradiation of locally advanced head and neck cancer: influence of tumour proliferation. *Radiother Oncol.* 25(4):261-6.

Bachmeier, B.E., A.G., Nerlich, R., Lichtinghagen, and C.P., Sommerhoff. 2001. Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res.* 21:3821-8.

Bachmeier, B. E., A., Albini, R., Vene, R., Benelli, D., Noonan, C., Weigert, C., Weiler, R., Lichtinghagen, M., Jochum, and A. G., Nerlich. 2005. Cell density-dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in differently tumorigenic breast cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 305: 83–98.

Balduyck, M., F., Zerimech, V., Gouyer, R., Lemaire, B., Hemon, G., Grard, C., Thiebaut, V., Lemaire, E., Dacquembronne, T., Duhem, A., Lebrun, M.J., Dejonghe, and G., Huet. 2000. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. Clin Exp Metastasis. 18:171-8.

Bartsch, J.E., E.D., Staren, and H.E., Appert. 2003. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. J Sur Res. 110:383-392.

BD Biosciences, Matrigel™'s Characterization. 2005.

http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/Products/cell_environments_and_ECMs/extracellular_matrix/basement_membrane_matrix/index.shtml

Belkhiri, A., C., Richards, M., Whaley, S.A., McQueen, and F.W., Orr. 1997. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure. Lab Invest. 77:533-9.

Bodey, B., B.Jr., Bodey, S.E., Siegel, and H.E, Kaiser. 2001. Matrix metalloproteinases in neoplasm-induced extracellular matrix remodeling in breast carcinomas. Anticancer Res. 21:2021-8.

Bredin, C.G., Z., Liu, and J., Klominek. 2003. Growth factor-enhanced expression and activity of matrix metalloproteases in human non-small cell lung cancer cell lines. Anticancer Res. 23:4877-84.

Brennan M., N., Wilcken, J., French, O., Ung, and J. Boyages. 2005. Management of early breast cancer--the current approach. Aust Fam Physician. 34(9):755-60.

Brew, K., D., Dinakarbandian, and H., Nagase. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem & Biophys Acta*. 1477: 267-283.

Bush, T.L., E., Barrett-Connor, L.D., Cowan, M.H., Criqui, R.B., Wallace, C.M., Suchindran, H.A., Tyroler, and B.M., Rifkind. 1987. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation*. 75(6):1102-9.

Chin, D., G. M., Boyle, A. J., Kane, D. R., Theile, N., K. Hayward, P. G., Parson, and W. B., Coman. 2005. Invasion and metastasis markers in cancers. *British J Plastic Surg*. 58: 466–474.

Cho, L., and D., Mukherjee. 2005. Hormone replacement therapy and secondary cardiovascular prevention : a meta-analysis of randomized trials. *Cardiology*. 104: 143-7.

Clark, I.M. 2001. Matrix metalloproteinase protocols. Humana Press Inc., Totowa.

Clemons, M., and P. Goss. 2001. Mechanisms of disease: Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 344:276-285.

Clemons, M., T., Hamilton, J., Mansi, G., Lockwood, and P., Goss. 2003. Management of recurrent locoregional breast cancer: oncologist survey. *The Breast*. 12:328-337.

Cowin, P., T.M. Rowlands and S.J., Hatsell. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 17: 499-508.

Dahiya, R., and G., Deng. 1998. Molecular pronostic markers in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 52(1-3):185-200.

Daja, M.M., X., Niu, Z., Zhao, J.M., Brown, and P.J., Russell. 2003. Characterization of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 6:15-26.

Dao, T.L. and H., Yogo. 1967. Enhancement of pulmonary metastasis by x-irradiation in rats bearing mammary cancer. *Cancer.* 20: 2020-5.

DeClerck, Y.A., S., Imren, A.M., Montgomery, B.M., Mueller, R.A., Reisfeld, and W.E., Laug. 1997. Proteases and protease inhibitors in tumor progression. *Adv Exp Med Biol.* 425:89-97.

Deryugina, E.I., B., Ratnikov, E., Monosov, T.I., Postnova, R., DiScipio, J.W., Smith, and A.Y., Strongin. 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 263(2):209-23.

Duffy, M. J., T. M., Maguire, A., Hill, E, McDermott and N, O'Higgins. 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2: 252–7.

Foda HD, S., George, C., Conner, M., Drews, D.C., Tompkins, and S., Zucker. 1996. Activation of human umbilical vein endothelial cell progelatinase A by phorbol myristate acetate: a protein kinase C-dependent mechanism involving a membrane-type matrix metalloproteinase. *Lab Invest.* 74(2):538-45.

Ford, H.T., R.C., Coombes, G. J.-C., R., Gray, C.C., McConkey, R., Sutcliffe, J., Quilliam, and S., Lowndes. 2005. Long-term follow-up of a randomised trial designed to determine the need for irradiation following conservative surgery for the treatment of invasive breast cancer. *Ann Oncol Epub ahead of print*

Fromigue, O., K., Louis, E., Wu, N., Belhacene, A., Loubat, M., Shipp, P., Auburger, and B., Mari. 2003. Active stromelysin-3 (MMP-11) increases MCF-7 survival in three-dimensional Matrigel culture via activation of p42/p44 MAP-kinase. *Int J Cancer*. 106:355-63.

Garbett, E.A., M.W., Reed, and N.J., Brown. 1999. Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer*. 81:287-93.

Gene database. 2005.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=5594

Giambernardi, T.A., G.M., Grant, G.P., Taylor, R.J., Hay, V.M., Maher, J.J., McCormick, and R.J., Klebe. 1998. Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol*. 16:483-96.

Goidin, D., A., Mamessier, M.J., Staquet, D., Schmitt, and O., Berthier-Vergnes. 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*. 295:17-21.

Greenspan, Basic & clinical endocrinology, Lange medical book, Appleton & Lange, 4^e Éd.,chap. 10, p. 424, Norwalk, Connecticut, 1994

Gruchow, H.W., A.J., Anderson, J.J., Barboriak, and K.A., Sobocinski. 1988. Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. Am Heart J. 115(5):954-63.

Hall, E.J.. 2000. Radiation, the two-edged sword: cancer risks at high and low doses. Cancer J. 6(6):343-50.

Hammond C.B., and W.S., Maxson. 1996. Estrogen replacement therapy. Clin Obstet Gynecol. 29(2):407-30.

Hanemaaijer, R., J. H., Verheijen, T. M., Maguire, H., Visser, K., Toet, E., McDermott, N., O'Higgins and M. J., Duffy. 2000. Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. Int. J. Cancer: 86: 204–7.

Hayakawa, T. 2002. Multiple functions of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): a new aspect involving osteoclastic bone resorption. J Bone Miner Metab. 20(1): 1-13.

Hayes, D.F. 2005. Prognostic and predictive factors revisited. Breast. 14(6):493-9.

Herrera-Gayol A. and S. Jothy. Adhesion proteins in biology of breast cancer: contribution of CD44. 1999. Exp Mol Pathol. 66: 149-156.

Hornebeck, W., H., Emonard, J.C., Monboisse, and G., Bellon. 2002. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 12:231-41.

Iwata, H., S., Kobayashi, H., Iwase, A., Masaoka, N., Fujimoto, and Y., Okada. 1996. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 87:602-11.

Jones, J.L., P., Glynn, and R.A., Walker. 1999. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1- MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol.* 189:161-8.

Johansson, N., M., Vaalamo, S., Grenman, S., Hietanen, P., Klemi, U., Saarialho-Kere, and V.M., Kahari. 1999. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 154:469-80.

Kaplan, H.S., and E.D., Murphy. 1949. The effect of local roentgen irradiation on the biological behavior of a transplantable mouse carcinoma. I. Increased frequency of pulmonary metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 9:407-413.

Kawaguchi, Y., H., Tanaka, T., Okada, H., Konishi, M., Takahashi, M., Ito, and J., Asai. 1996. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res.* 288:39-44.

Koshikawa, N., G., Giannelli, V., Cirulli, K., Miyazaki, and V., Quaranta. 2000. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* 148:615-24.

Kousidou, O.C., A.E., Roussidis, A.D., Theocharis, and N.K., Karamanos. 2004. Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res.* 24:4025-4030.

Kowalski, P. J., M. A., Rubin and C. G., Kleer. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. 2003. *Breast Cancer Research* 5: R217-222.

Kumar, V., Cotran, RS., and S. L., Robbins. 1997. Female genital system and breast. In *Basic Pathology*. W.B. Saunders, editor. W.B Saunders, Philadelphia. 597-635.

Li, B-H., P., Zhao, S-Z., Liu, Y-M., Yu, M., Han, and J-K., Wen. 2005. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis *World J Gastroenterol* 11(20):3046-3050.

Liehr, J.G., and M.J., Ricci. 1996. 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3294-6.

Mimori, K., H., Ueo, C., Shirasaka, and M., Mori. 2001. Clinical significance of MT1-MMP mRNA expression in breast cancer. *Oncol Rep.* 8:401-3.

Marhaba R. and M. Zöller. 2004. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol.* 35: 211-31.

Munshi, H.G., Y.I. Wu, S. Mukhopadhyay, A.J. Ottaviano, A. Sassano, J.E. Koblinski, L.C. Plataniias, and M.S., Stack. 2004. Differential regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase activity by ERK 1/2- and p38 MAPK-

modulated tissue inhibitor of metalloproteinases 2 expression controls transforming growth factor-beta1-induced pericellular collagenolysis. *J Bio Chem.* 279:39042-39050.

Murphy, G., and A.J., Docherty. 1992. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7:120-5.

Nathanson, S.D., P., Westrick, P., Anaya, F.W. Hetzel, and G., Jacobsen. 1989. Relationship of spontaneous regional lymph node metastasis to dose of local irradiation of primary B16 melanoma. *Cancer Res.* 49: 4412-6.

Nawroski Raby, B., M., Polette, C., Gilles, C., Clavel, K., Strumane, M., Matos, J.-M., Zahm, F., Van Roy, N., Bonnet, and P., Birembaut. 2001. Quantitative cell dispersion analysis : new test to measure tumor cell aggressiveness. *Int J Cancer.* 93:644-652.

Nelson, A., R., Fingleton, B., Rothenberg M. L., and L. M., Matrisian. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncology*, 18 (5):1135-1149.

Okamoto, T., T., Akaike, T., Nagano, S., Miyajima, M., Suga, M., Ando, K., Ichimori, and H., Maeda. 1997. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 342:261-74.

Okobia, M.N., and C.H., Bunker. 2005. Epidemiological risk factors for breast cancer--a review. *Niger J Clin Pract*, 8(1):35-42.

Osenkowski, P., M., Toth, and R. Fridman. 2004. Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol* 200:2-10.

Paquette, B., M., Bisson, C., Baptiste, H., Therriault, R., Lemay and A.M., Cantin. 2004. Invasiveness of breast cancer cells MDA-MB-231 through extracellular matrix is increased by the estradiol metabolite 4-hydroxyestradiol. *Int J Cancer*. 113(5):706-711.

Paquette, B., M., Bisson, H., Therriault, R., Lemay, M., Pare, P., Banville, and A.M., Cantin. 2003. Activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 by 2- and 4-hydroxyestradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 87:65-73.

Polette, M., C., Clavel, M., Cockett, S., Girod de Bentzmann, G., Murphy, and P., Birembaut. 1993. Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion Metastasis*. 13:31-7.

Porter, G. J. R., A. J., Evans, S. E., Pinder, J. J., James, E. C., Cornford, H. C., Burrell, S. Y., Chan, K. L., Cheung and J. F. R., Robertson. 2004. Patterns of metastatic breast carcinoma: influence of tumour histological grade. *Clin. Radiol*. 59(12):1094-1098.

Poulsom, R., A.M., Hanby, M., Pignatelli, R.E., Jeffery, J.M., Longcroft, L., Rogers, and G.W., Stamp. 1993. Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. *J Clin Pathol*. 46:429-36.

Rajagopalan, S., X.P., Meng, S., Ramasamy, D.G., Harrison, and Z.S., Galis. 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 98:2572-9.

Ratnikov, B.I., E.I., Deryugina, and A.Y., Strongin. 2002. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest.* 82:1583-90.

Reed, M.J., A.M., Owen, L.C., Lai, N.G., Coldham, M.W., Ghilchik, N.A., Shaikh, and V.H., James. 1989. In situ oestrone synthesis in normal breast and breast tumour tissues: effect of treatment with 4-hydroxyandrostenedione. *Int J Cancer.* 44:233-7.

Rifici, V.A., Khachadurian, A.K.. 1992. The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17-beta estradiol. *Metabolism.* 41(10):1110-4.

Rogan, E.G., A.F. Badawi, P.D. Devanesan, J.L. Meza, J.A. Edney, W.W. West, H. S.M., and E.L. Cavalieri. 2003. Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer. *Carcinogenesis.* 24:697-702.

Saari, H., K., Suomalainen, O., Lindy, Y.T., Konttinen, and T., Sorsa. 1990. Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 171:979-87.

SANTÉ CANADA, 2005. http://www.phac-aspc.gc.ca/ccdpc-cpcmc/bc-cds/index_f.html

Sato, H., T., Takino, and H., Miyamori. 2005. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 96:212-7.

Schenk, S., E., Hintermann, M., Bilban, N., Koshikawa, C., Hojilla, R., Khokha, and V., Quaranta. 2003. Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol.* 161:197-209.

Schenk, H., M., Klein, W., Erdbrugger, W., Droge, and K., Schulze-Osthoff. 1994. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:1672-6.

Seghal, I., and T.C., Thompson. 1999. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor- β 1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell.* 10:407-410.

Seiki, M.. 2003. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett.* 194:1-11.

Shaughnessy, S.G., M., Whaley, R.M., Lafrenie, and F.W., Orr. 1993. Walker 256 tumor cell degradation of extracellular matrices involves a latent gelatinase activated by reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 1;304(2):314-21.

Shiomi, T. and Y., Okada. 2003. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 22:145-52.

SIGMA-ALDRICH, www.sigmaaldrich.com/img/assets/10940/MMP-7&26.jpg

SIGMA-ALDRICH, www.sigmaaldrich.com/img/assets/10940/MMP-14-etc.jpg

Slamon, D.J., G.M., Clark, S.G., Wong, W.J., Levin, A., Ullrich, and W.L., McGuire. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

Spinks, J.W.T., and R.J., Woods. 1990. Water and inorganic aqueous systems, *Introduction to Radiation Chemistry*. John Wiley & Sons Inc. 243-313.

Stetler-Stevenson, W.G., and E. Y., Anita. 2001. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *semin Cancer Biol*. 11:143–152.

Strup-Perrot, C., D., Mathé, C. ,Linard, D., Violot, F., Milliat, A., François, J., Bourhis, and M.C., Vozenin-Brotons. 2004. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287:G875-G885.

Talvensaari-Mattila, A., P., Paakko, M., Hoyhtya, G., Blanco-Sequeiros, and T. Turpeenniemi-Hujanen. 1998. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer*. 83:1153-62.

Takino, T., H., Miyamori, Y., Watanabe, K., Yoshioka, M., Seiki, and H., Sato. 2004. MT1-MMP regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related activation and cell migration. *Cancer Res*. 64:1044-1049.

Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. 2002. Nature. 2: 442-454.

Ueno, H., H., Nakamura, M., Inoue, K., Imai, M., Noguchi, H., Sato, M., Seiki, and Y., Okada. 1997. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. Cancer Res. 57:2055-60.

Von Essen, C.F. 1991. Radiation enhancement of metastasis : a review. Clin Exp Metastasis. 9: 77-104.

Yana, I., and M., Seiki. 2002. MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination. Clin & Exp. Metastasis. 19:209-215.

Yao, G.Y., M.T., Yang, T.H., Rong, and P., He. 2004. [Significance of membrane type-1 matrix metalloproteinase expression in breast cancer]. Ai Zheng. 23:1482-6.